UNTERSUCHUNGEN ZUM KALIUMHAUSHALT VON STREPTOMYCES GRISEUS UND EINER MAKROTETROLID–NEGATIVEN MUTANTE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

REINHARD KANNE

aus Bad Salzuflen

1974

74 464

UNTERSUCHUNGEN ZUM KALIUMHAUSHALT VON STREPTOMYCES GRISEUS UND EINER MAKROTETROLID–NEGATIVEN MUTANTE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

REINHARD KANNE

aus Bad Salzuflen

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:		12. September 1974
Dekan	:	Professor Dr. D. Sperlich
1. Berichterstatter	:	Professor Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter	:	Professor Dr. V. Braun

aku- Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II der Universität Tübingen, Lehrbereich Mikrobiologie I ausgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die zahlreichen Anregungen und die großzügige Unterstützung danke ich Herrn Professor Dr. H. Zähner.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. K. Altendorf für wertvolle Diskussionen sowie Herrn Wusch für die Anfertigung der Zeichnungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-triphosphatase
cpm	Impulse (counts) pro Minute
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
RNA	Ribonucleinsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
t-RNA	Transfer-Ribonucleinsäure

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0072

1. Einleitung

Die Bakterienzelle ist wie alle Zellen von einer Cytoplasmamembran umgeben. Ihre Aufgabe besteht in einem kontrollierten Stoffaustausch zwischen Cytoplasma und Medium. Auf diese Weise werden, weitgehend unabhängig von in der Zelle anfallenden Stoffwechselprodukten und Veränderungen in der Zusammensetzung des umgebenden Mediums, für den Stoffwechsel der Zelle optimale Bedingungen erreicht.

Der Stoffaustausch vollzieht sich mit Hilfe spezifischer, in der Membran gelegener Transportsysteme. Eine Zusammenfassung der mit genetischen Methoden untersuchten Mechanismen für den Transport von Zuckern, Aminosäuren, Peptiden und anorganischen Ionen gibt ein Übersichtsartikel von Lin (1970). Short und Mitarbeiter (1972) konnten zum Beispiel an Membranvesikeln von Staphylococcus aureus zwölf verschiedene, für bestimmte Aminosäuren spezifische Transportsysteme nachweisen. Erste Arbeiten über den Transport anorganischer Ionen beschrieben Systeme für Phosphat (Mitchell, 1954), Kalium (Lubin u. Kessel, 1960) und Sulfat (Dreyfuß, 1966).

Auffällig an biologischen Transportsystemen ist ihre Fähigkeit, große Konzentrationsgradienten aufzubauen. Eine Anreicherung von $1:10^3$ ist normal. Kalium ist das Ion, das am stärksten in der Zelle angereichert wird. Für E. coli wurde ein Anreicherungsfaktor von $1:10^6$ nachgewiesen (Harold, 1972). Entsprechend der starken Anreicherung hat Kalium eine entscheidende Bedeutung für die normale Funktion einer Bakterienzelle. Die Stoffwechselfunktionen des Kalium lassen sich in zwei Gruppen aufteilen:

1. Intracelluläre Wirkung auf biochemische Vorgänge in der Zelle
2. Beteiligung am Transport von Nährstoffen in die Zelle

Nach Suelter (1970) sind mehr als 60 Enzymsysteme bekannt, die hauptsächlich durch Kalium, in geringerem Maße auch durch andere einwertige Kationen aktiviert werden. Man vermutet, daß die Kationen eine Konformationsänderung hervorrufen, wodurch die Enzyme in ihre aktive Form übergehen (Evans u. Sorger, 1966). Gestützt wird diese Hypothese durch Beobachtungen von Veränderungen der spektroskopischen (Suelter et al., 1966) und immunoelektrophoretischen Eigenschaften (Sorger et al., 1965) der Enzyme nach Aktivierung durch Kationen.

Wie Untersuchungen an Mutanten von E. coli und Bacillus subtilis, mit Schädigungen im Kaliumtransport, ergaben, hemmt Kaliummangel die Protein-, die Lipid-und die Nucleotidbiosynthese, während die RNA-, DNA-und Mureinbiosynthese unbeeinflusst bleiben (Ennis et al., 1973). Die hauptsächliche Wirkung des Kalium auf die Proteinsynthese scheint in einer Stabilisierung der Polysomen zu liegen (Ennis, 1971). Außerdem wird bei niederen Kaliumkonzentrationen die Translokation der Aminosäuren von der t-RNA auf das Polypeptid gehemmt (Lubin u. Ennis, 1964).

Nach Messungen von Epstein und Schultz (1968) ist die Kaliumkonzentration in der Zelle abhängig von der Osmolarität des Mediums. Daraus leiten sie eine bedeutende Rolle des Kalium in der Osmoregulation der Zelle ab.

Neben diesen intracellulären Wirkungen liegt eine weitere wichtige Bedeutung des Kalium in seiner Beteiligung an der Aufnahme anderer Stoffe in die Zelle. So ist die Permeation von Oligosacchariden durch die Cytoplasmamembran abhängig von Kalium und einer Energiequelle (Abrams, 1960). Zimmermann und Pilwat (1971) stellten eine Kopplung zwischen der Aufnahme der Aminosäuren Leucin, Histidin und Kalium bei E. coli fest, was mit den Ergebnissen von Eddy und Nowacki (1971) übereinstimmt, daß Kalium und Protonen Cosubstrate für den Transport von Aminosäuren sind.

Noch weitgehend ungeklärt ist der Mechanismus, der Mikroorganismen in die Lage versetzt, die beschriebenen großen Kaliumkonzentrationsgradienten aufzubauen, aufrechtzuerhalten und zu regulieren. Bei der Suche nach Stoffen mit antibiotischer Wirkung wurden Verbindungen gefunden, die in der Lage sind, den Kaliumhaushalt der Zelle zu stören (Graven et al., 1967). Sie lassen sich in zwei Gruppen einteilen (Simon et al., 1969).

1. Stoffe, die mit einwertigen Kationen positiv geladene Komplexe bilden:

   Valinomycin
   Grammicidine
   Enniatine
   Makrotetrolide

2. Stoffe, die bei physiologischem pH-Wert mit einwertigen Kationen elektrisch neutrale Komplexe bilden:

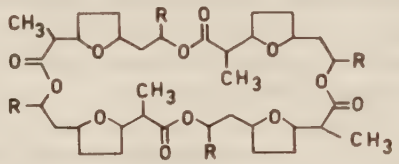
   Nigericin
   Monensin
   Dianemycin

Ein weiteres Kalium komplexierendes Antibioticum ist das Boromycin, der erste borhaltige Naturstoff (Pache, 1969).

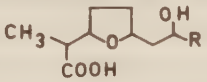
Die Makrotetrolide wurden bisher ausschließlich in Kulturen von Actinomycetenstämmen nachgewiesen. Innerhalb der Actinomyceten scheinen diese Verbindungen jedoch verbreitet zu sein (Keller-Schierlein u. Gerlach, 1968). Als erste Verbindung dieser Gruppe isolierten Corbaz et al. (1955) das Nonactin. Bis heute konnten neun Homologe dieser Verbindung nachgewiesen werden (Beck et al., 1962; Gerlach et al., 1967; Suzuki et al., 1971).

Die Konstitution der Makrotetrolide konnte 1962 durch Dominguez und Mitarbeiter aufgeklärt werden.

Konstitution der Makrotetrolide:



Durch alkalische Hydrolyse oder durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid lassen sich die Substanzen in 4 Mol Hydroxysäure bzw. Diol zerlegen. Folgende Hydroxysäuren sind aus den bekannten Makrotetroliden isoliert worden:



R = CH_3 : Nonactinsäure
R = CH_2-CH_3 : Homononactinsäure
R = $CH(CH_3)_2$: Bishomononactinsäure

Die Homologen unterscheiden sich durch den unterschiedlichen Anteil der drei Säuren am Molekül.

Die Antibiotica sind neutrale, farblose und bis auf eine Substanz kristalline Verbindungen. Mit einwertigen Kationen bilden sie positiv geladene 1:1 Komplexe (Pioda et al., 1967; Kilbourne et al., 1967). Hierbei windet sich der Ring des Moleküls wie die Naht eines Tennisballes um das Kation, so daß die lipophilen Gruppen nach außen stehen. Die so entstehenden lipophilen Komplexe steigern die Permeabilität von künstlichen und natürlichen Membranen für die komplexierten Kationen um das 10^8-fache (Mueller u. Rudin,

1967; Eisenman et al., 1968; Keller-Schierlein et al., 1969; Tosteson, 1968). Hierbei ist das Kalium gegenüber den anderen Alkalimetallen um den Faktor 300 bevorzugt. Es läßt sich folgende Selektivitätsreihe aufstellen:

$$Li < Na < Cs < Rb < K$$

Die Selektivität läßt sich durch unterschiedliche Komplexbildungskonstanten auf Grund der unterschiedlichen Atomradien (Simon et al., 1969), oder durch unterschiedliche physikalische Eigenschaften der Komplexe (Tosteson, 1968) erklären.

Erste intakte biologische Systeme, an denen die Wirkung der Makrotetrolide untersucht wurde, waren Rattenlebermitochondrien, bei denen die Antibiotica in Konzentrationen von 10^{-7} Mol/l folgende Effekte hervorrufen:

1. Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und Stimmulierung der ATPase-Aktivität (Graven et al., 1966).

2. Veränderung der Lichtstreuungseigenschaften, was auf ein Anschwellen der Mitochondrien schließen läßt (Graven et al., 1966).

3. Steigerung der Atmung und verstärkten Kaliumeinfluß in die Mitochondrien (Graven et al., 1967).

Valinomycin hat im wesentlichen die gleiche Wirkung auf Mitochondrien wie die Makrotetrolide (Moore und Pressman, 1964).

Bei Mikroorganismen führen die Antibiotica der Valinomycingruppe zu einer Wachstumshemmung, die u.a. abhängig von der Kaliumkonzentration in den Testmedien ist. Es lassen sich zwei Gruppen unterscheiden:

1. Bei Bacillus subtilis wird die antibiotische Wirkung durch steigende Kaliumkonzentrationen verstärkt (Seshachalam et al., 1973), was ähnlich wie bei Mitochondrien auf eine Störung des Zellstoffwechsels durch

übermäßig einfließendes Kalium schließen läßt (Cockrell et al., 1966).

2. Die Wirkung der Antibiotica läßt sich durch Erhöhung der extracellulären Kaliumkonzentration aufheben, was auf ein durch die Antibiotica katalysiertes Ausfließen des Kalium aus der Zelle schließen läßt (Harold u. Baarda, 1967; 1968; Lentz, 1971).

Aus den Erkenntnissen über die Wirkungsweise der Makrotetrolide leiteten Keller-Schierlein und Zähner die Kaliumcarrierhypothese für die ionophoren Antibiotica ab (Keller-Schierlein, 1969; Zähner, 1969). Nach dieser Hypothese sind die Substanzen Bestandteile des physiologischen Kaliumtransportes, durch deren Überangebot der Kaliumhaushalt gestört und die antibiotische Wirkung hervorgerufen wird. Die geringe Menge an für den Transport benötigten Carriern erklärt, warum solche Carrierstoffe nicht in allen Organismen nachgewiesen werden können, während man für die als Produzenten bekannten Stämme eine Deregulation der Carrierbiosynthese annehmen kann.

Die folgenden Punkte können als Stütze für diese Hypothese gelten:

1. Membranvesikel von E. coli können kein Kalium akkumulieren. Durch Zugabe von Valinomycin wird diese Fähigkeit rekonstituiert (Bhattacharyya et al., 1971).

2. Bei niederen Kaliumkonzentrationen wird in Zellen von Azotobacter vinelandii die Kaliumaufnahme und Oxidation von C-Quellen durch Zugabe von Valinomycin stimuliert (Visser u. Postma, 1973).

3. Kalium und Rubidium sind äquivalente Substrate für die Untersuchung von Kaliumtransportsystemen. Valinomycin steigert den Transport von Rubidium in Membranvesikel von E. coli, Staphylococcus aureus und Micrococcus denitrificans (Lombardi et al., 1973).

Ungeklärt bleibt, ob es sich hierbei um physiologische Vorgänge handelt. Ansätze zu einem Beweis der Hypothese wären u.a. auf folgenden Wegen zu gewinnen:

1. Nachweis von ionophoren Stoffen in allen sich noch vermehrenden Zellen.- Bei den zu erwartenden extrem geringen Mengen und der Mannigfaltigkeit der ionophoren Antibiotica reichen die bis heute vorhandenen analytischen Methoden kaum aus.

2. Deregulation der Biosynthese dieser Stoffe bei Organismen, die bisher nicht als Produzenten derartiger Antibiotica bekannt sind.

3. Wesentlich verbesserte Kenntnisse über den cellulären Kaliumtransport.

4. Untersuchungen zum Kaliumhaushalt von Mutanten, die die Fähigkeit zur Synthese ionophorer Antibiotica verloren haben.

Die vorliegende Arbeit soll klären, ob sich mit Hilfe der in Punkt 4. vorgeschlagenen Methode Anhaltspunkte für die Carrierfunktion der Makrotetrolide finden lassen. Als Ausgangsstamm diente ein sehr guter Makrotetrolidproduzent. Eine Selektion von Minusstämmen aus diesem Antibioticaproduzenten sollte, wenn die Hypothese von der deregulierten Biosynthese richtig ist, zu Stämmen führen, die auch die extrem geringe, für den Kaliumhaushalt der Produzentenzelle notwendige Menge an ionophoren Substanzen nicht mehr bilden. Eine Mutation in einem der zahlreichen Strukturgene müßte zu einem totalen Verlust der Biosynthesefähigkeit führen und ist um vieles wahrscheinlicher als eine Mutation im Bereich der Regulation, die die deregulierte Biosynthese wieder " reparieren " würde. Bei derartigen Makrotetrolid-minus-Stämmen müssten, bei Richtigkeit der Hypothese, Untersuchungen über die folgenden Punkte Unterschiede zwischen Wildstamm und Mutante ergeben:

1. Bestimmung der minimalen, für das Wachstum der Testorganismen benötigten Kaliummenge.
2. Auswirkung steigender Kaliumkonzentrationen auf das Wachstum.
3. Einfluß der Konkurrenz zwischen Kalium und Natrium auf Wachstum und Kaliumaufnahme.
4. Messung der intracellulären Kaliumkonzentrationen.
5. Messung der Kaliumaufnahme.
6. Hemmung der Kaliumaufnahme durch Hemmstoffe.

2. Material und Methoden

2. 1. Chemikalien

Außer den aufgeführten Chemikalien wurden alle weiteren bei der Arbeit verwendeten Substanzen analysenrein von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

1. Chemikalien für Nährmedien

Agar Hefeextrakt Malzextrakt	Diffco Laboratories Detroit, Mich., USA
D-Glukose, rein Stärke, löslich	Riedel De Haen AG, Seelze Hannover
Tween 40, rein	Serva Feinbiochemica GMBH&Co, Heidelberg

2. Chemikalien für Kalium-, Natriumbestimmungen

Salpetersäure 65%, Suprapur	Merck, Darmstadt
Inulin-(Carboxylic Acid-C^{14})	Radiochemical Centre, Amersham

3. Chemikalien für Hemm-und Rekonstitutionsversuche

Makrotetrolidgemisch (entsprechend der Produktion durch Streptomyces griseus Tü10) Valinomycin	Dr. Pape, Institut Biologie II der Universität Tübingen
g-Strophantin(Ouabain)	Boehringer Mannheim GMBH, Mannheim

2. 2. Testorganismen

1. Streptomyces griseus (Hütter, 1967) Stamm Tü10 (ETH 7796) des Lehrbereichs Mikrobiologie der Universität Tübingen. Unter optimalen Bedingungen produziert der Stamm über 3 g an Makrotetroliden pro Liter Kultur (Pape, 1972).

2. Mutante M4 von Tü10, isoliert von Klein-Vogler (1973). Die Mutante wurde unter Bedingungen, die beim Wildstamm maximale Antibioticaproduktion hervorrufen (Pape, 1972) mit Hilfe eines Gaschromatographen auf Makrotetrolidproduktion überprüft. In dem Zellextrakt der Mutante konnten keine Bruchstücke der Makrotetrolide nachgewiesen werden, was eine Produktion nur in unter der Nachweisgrenze des Gaschromatographen liegenden Mengen zuläßt (Kanne, 1973).

Neben dem Verlust der Makrotetrolidproduktion unterscheidet sich die Mutante in den in Tabelle 1. angegebenen Merkmalen von dem Wildstamm.

Tabelle 1.: Unterschiede zwischen Wildstamm und Mutante

Merkmal	Wildstamm	Mutante
Makrotetrolid-produktion	+	nicht nachweisbar
Pigmentbildung	bei sehr alten Kulturen Spuren eines roten Pigmentes; sonst grünlich	rotes Pigment mit antibiotischer Wirkung; gehört zur Gruppe der Anthracycline
Amylaseaktivität	in Nährlösungen mit 2% Stärke sind nach 48 Std. nur noch 0,1% nachweisbar	nach 144 Std. sind in der gleichen Nährlösung noch ca 1% Stärke nachweisbar

Es ist nicht geklärt, ob diese Unterschiede Folge fehlender Makrotetrolidproduktion oder zusätzlicher Mutationen sind (Klein-Vogler, 1973). Es ist auch möglich, daß hier, wie bei Streptomyceten mehrfach nachgewiesen (Hopwood, 1973), ein Episomenverlust oder eine Kernentmischung vorliegt.

2. 3. Nährmedien

Medium I.: Komplexmedium für Streptomyceten (Pridham et al., 1956/57)

Hefeextrakt	4,00	g
Malzextrakt	10,00	g
D-Glukose	4,00	g
Wasser	1,00	l

Medium II.: Mineralisches Substrat nach Gause (1958) zur Anzucht von Sporen und zur Stammhaltung

KNO_3	1,00	g
K_2HPO_4	0,50	g
$MgSO_4$	0,50	g
NaCl	0,50	g
$FeSO_4$	0,01	g
Stärke	20,00	g
Agar	20,00	g
IA-Wasser	1,00	l

Medium III.: Synthetisches Medium ohne Kalium und Natrium

$(NH_4)_2HPO_4$	0,660	g
NH_4NO_3	0,800	g
$MgSO_4$	0,250	g
$MgCl_2$	0,400	g
$FeSO_4$	0,005	g
Stärke	5,000	g
IA-Wasser	1,000	l

Dem Medium III wurden die in den einzelnen Versuchen angegebenen Mengen an Kalium und Natrium als Chloride zugesetzt.

Für Versuche mit Gradientenplatten enthielt Medium III zusätzlich 2% Agar. Die Herstellung der Platten erfolgte nach der Vorschrift von Zähner (1965).

Bei Verwendung von Medium III mit 1,0 mMol K^+/l und Medium III ohne Zusatz von Kalium erhält man an der Oberfläche der Agarschicht einen Kaliumgradienten von etwa 0,01-1,0 mMol/l. Platten mit einem Natriumgradienten von 0,02-1000 mMol/l erhält man durch Anwendung von Medium III mit 1 Mol Na^+/l und Medium III ohne Natriumzusatz. Die Kaliumkonzentration dieser Platten liegt bei 0,01 mMol/l.

Zum Animpfen wurden die Platten mit einer, die Testkeime enthaltenden, Agarschicht übergoßen. Hierfür wurden in 100ml Medium III + Agar 0,1 ml einer 48 Stunden alten Vorkultur in Medium I suspendiert.

2. 4. Kulturbedingungen

Inkubationstemperatur war 27 Grad Celsius

Als Kulturgefäße für Flüssigkulturen dienten 500 ml Erlenmeyerkolben mit vier seitlichen Einstichen. Die Kolben waren jeweils mit 100 ml Medium gefüllt. Die Inkubation erfolgte auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 120 U/Min. Als Impfmaterial diente 1ml einer Sporensuspension.

Die Herstellung der Sporensuspension erfolgte wie früher beschrieben (Kanne, 1972). Die Suspension wurde dreimal mit sterilem IA-Wasser gewaschen und mit Hilfe eines Eppendorf-Photometers bei 578 nm auf eine Extinktion von 0,1 eingestellt. Der Titer dieser Suspension lag bei 10^7 Sporen pro Milliliter.

2. 5. Trübungsmessung als Maß für das Wachstum einer Flüssigkultur

Das Wachstum der Testorganismen wurde anhand der Trübungszunahme in der Kulturflüssigkeit bei 578 nm im Eppendorf-Photometer gemessen. Vorversuche ergaben, daß die so aufgenommenen Wachstumskurven mit denen vergleichbar sind, die man durch Messen des Zelltrockengewichtes erhält.

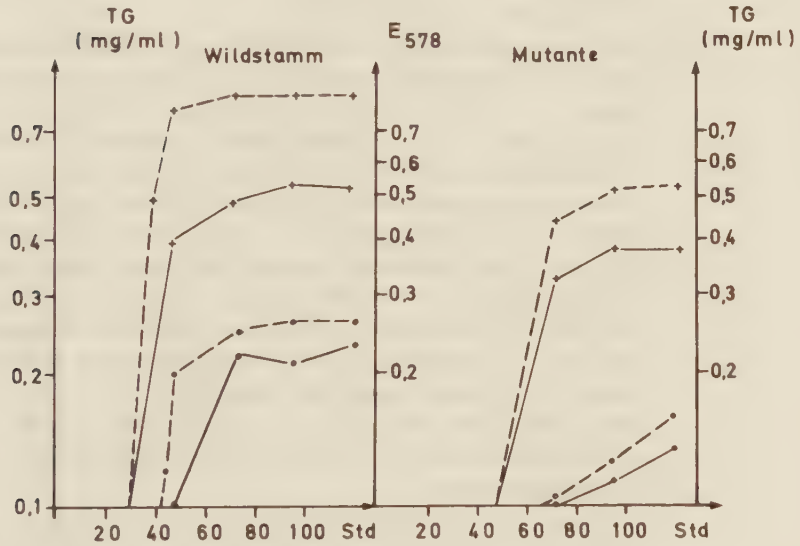


Abbildung 1.: Wachstumsmessung von Wildstamm und Mutante durch Bestimmung des Zelltrockengewichtes ——— und durch Extinktionsmessung bei 578 nm -----, bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen in Medium III ohne Natrium. x——x = 5 mMol K^+/l; •——• = ohne Kaliumzusatz

2. 6. Quantitative Bestimmung von Kalium und Natrium

Die Kalium-, Natriumkonzentrationen der Nährlösungen und die intracellulären Kalium-, Natriummengen wurden mit einem Flammenspektralphotometer für Absorptions-und Emissionsanalyse FA2/PMQ III der Firma Zeiss gemessen.

Die Atomabsorptionsanalyse beruht auf der Tatsache, daß jedes Element ein characteristisches Absorptionsspektrum besitzt.

Erläuterung des Meßvorganges:

Die zu untersuchende Probe wird in einer Zerstäuberkammer mit einem Brenngas, bestehend aus einem Propangas-Luftgemisch, vermischt. Das Gas-Probengemisch speist eine Flamme, die sich im Strahlengang einer Lichtquelle befindet. Die Lichtquelle sendet Licht einer für Kalium bzw. Natrium characteristischen Wellenlänge aus. Durch die thermische Energie der Flamme werden die in der Probe befindlichen Kalium und Natriumatome angeregt und absorbieren einen Teil des ausgesendeten Lichtes. Die Stärke der Absorption ist ein Maß für die Konzentration des entsprechenden Atoms in der Probe. Mit Hilfe eines lichtelektrischen Empfängers werden die Veränderungen der Lichtintensität auf einem Anzeigegerät sichtbar gemacht, oder mit Hilfe eines Transmissions-Extinktions-Wandlers von einem Kompensationsschreiber aufgezeichnet.

Geeicht wird das Meßgerät durch Zerstäuben verschiedener Proben mit bekannter Kalium-oder Natriumkonzentration. Es ergeben sich die in Abbildung 2. gezeigten Eichkurven.

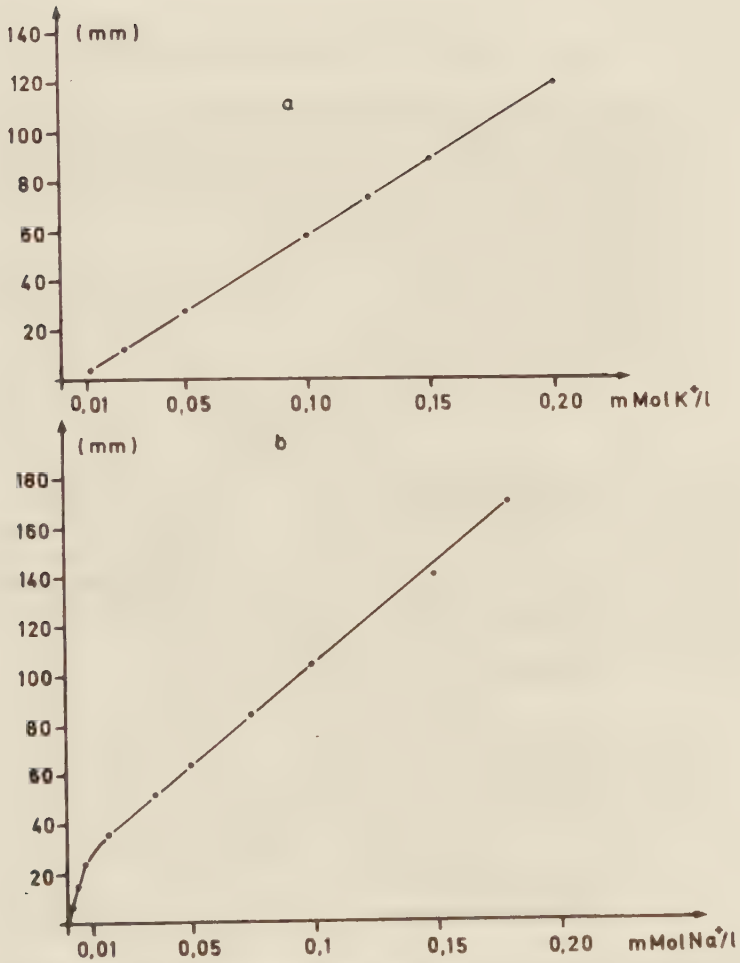
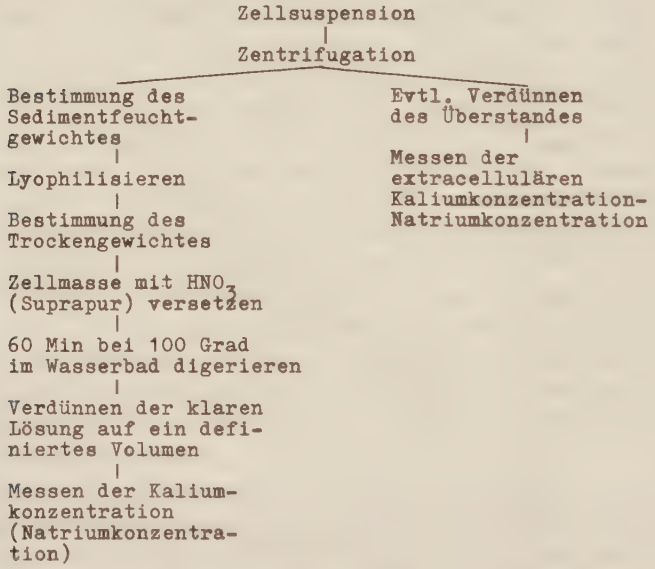


Abbildung 2.: Eichkurven für Kalium (a) und Natrium (b). Gemessen wurde Medium III mit definierten Kalium- und Natriumkonzentrationen.

2. 7. Messung intracellulärer Kalium-, Natriummengen

Um die Menge des Kalium oder Natrium in der Zelle messen zu können, muß man die Zellen aufschließen und die entsprechenden Ionen in Lösung bringen. Die Methode des Zellaufschlusses stammt bis auf geringe Abänderungen von Günther und Dorn (1966).

Aufarbeitung von Zellen zur Bestimmung intracellulärer Kalium-, Natriummengen:



2. 8. Bestimmung des extracellulären Raumes

Für die Messung intracellulärer Kalium-, Natriummengen werden die Zellen abzentrifugiert. Hierbei bleiben Reste des Mediums an den Zellen haften. Dieser sogenannte extracelluläre Raum verfälscht je nach Kalium-oder Natriumkonzentration des Mediums die Messungen mehr oder weniger stark. Um den Kalium-bzw. Natriumgehalt der Proben auf die Konzentration im Zellwasser beziehen zu können, muß man deshalb den extracellulären Raum bestimmen. Die Messung erfolgte mit Hilfe der C^{14}-Inulinmethode. Als Vorlage diente die Beschreibung von Zimmermann und Pilwat (1971). Sie wurde in mehreren Punkten abgeändert.

Die zu untersuchende Zellsuspension wurde mit einer definierten Menge C^{14}-Inulin vermischt. Die Inulinmenge war auf eine Aktivität in der Flüssigkeit von 2×10^{-5} mCi/ml berechnet. Nach dem Abzentrifugieren wurde 1 ml des Überstandes in Szintillationsgläser gefüllt, der Rest verworfen und das Sediment nach Bestimmung des Feuchtgewichtes ebenfalls in Szintillationsgläser überführt. Beide Proben wurden getrocknet und nach Zusatz von 5 ml Szintillationsflüssigkeit die Zählausbeute bestimmt.

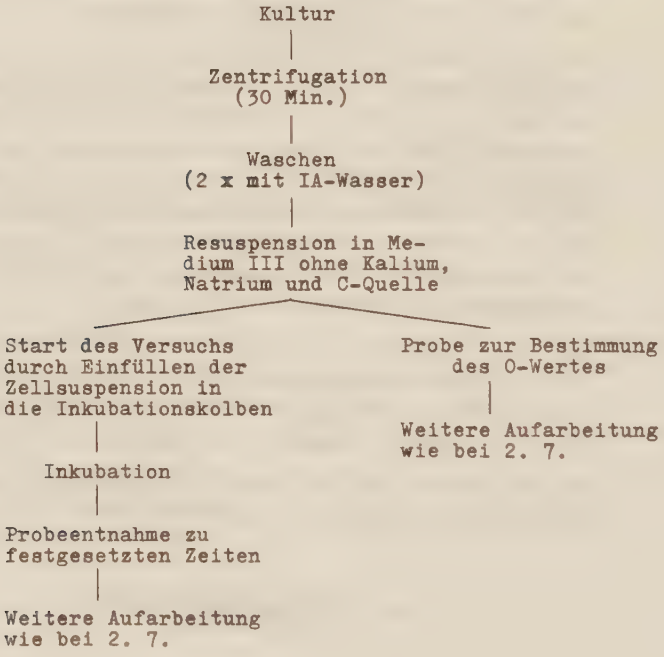
Die Quenchfaktoren der Zellen und der Mediumproben waren unter diesen Bedingungen gleich. Die Messung erfolgte in einem 3-Kanal-Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer (Mark I, Nuclear Chicago, Des Plaines III., USA).

Aus den Werten für die Zählausbeute errechnet sich der extracelluläre Raum (ER) folgendermaßen:

$$ER = \frac{\text{cpm/g Feuchtgewicht}}{\text{cpm/ml Medium}}$$

2. 9. Standardansatz für Kurzzeitversuche

Die Kurzzeitversuche wurden bei Zimmertemperatur und unter unsterilen Bedingungen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte auf einer rotierenden Tischschüttelmaschine bei 125 U/Min. Als Inkubationsgefäße dienten 50 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich. Die Erlenmeyerkolben enthielten eine C-Quelle, in der Regel Glukose, die benötigten Mengen an Kalium und Natrium und evtl. Ouabain und Makrotetrolide. Die Versuche wurden nach folgendem Schema durchgeführt:



3. Ergebnisse

3. 1. Wachstumsversuche

3. 1. 1. Wachstum auf Platten mit einem Kaliumgradienten

Mit Hilfe des Plattengradiententestes sollte versucht werden, eventuelle Unterschiede in der minimal für das Wachstum der beiden Teststämme notwendigen Kaliumkonzentration zu finden.

Bei Verwendung von Platten mit einem Kaliumgradienten von ca. 0,01-1,0 mMol K^+/l wachsen beide Testorganismen über die gesamte Agaroberfläche.

Es lassen sich mit der Methode keine Minimalansprüche an Kalium für das Wachstum feststellen.

3. 1. 2. Wachstum in Flüssigkulturen mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen

Der Gradientenplattentest ermöglicht nur eine Aussage über die für das Wachstum notwendige Kaliumkonzentration. Er gibt keine Aufschlüsse über die Auswirkung steigender Kaliumkonzentrationen auf das Wachstum.

Die in Abbildung 3. dargestellten Wachstumskurven für Flüssigkulturen bestätigen, daß schon Spuren an Kalium für das Wachstum, sowohl des Wildstammes, als auch der Mutante ausreichen. Weiterhin kann gezeigt werden, daß die Kaliumkonzentrationen der Nährlösungen sich nur in einem kleinen Bereich, etwa zwischen 0 und 1,0 mMol K^+/l begrenzend auf das Wachstum auswirken. Eine weitere Erhöhung der extracellulären Kaliumkonzentration bewirkt keine Verstärkung des Wachstums, wie Versuche mit Nährlösungen bis zu 100 mMol K^+/l bestätigten. Eine Steigerung der Kaliumkonzentration wirkt sich in erster Linie auf die Wachstumsrate und abgesehen von Nährlösungen mit sehr niederer Kaliumkonzentration weniger auf den Beginn des Wachstums, oder die Wachstumsgeschwindigkeit aus.

Bei allen Versuchen zeigt die Mutante ein geringeres und langsameres Wachstum als der Wildstamm.

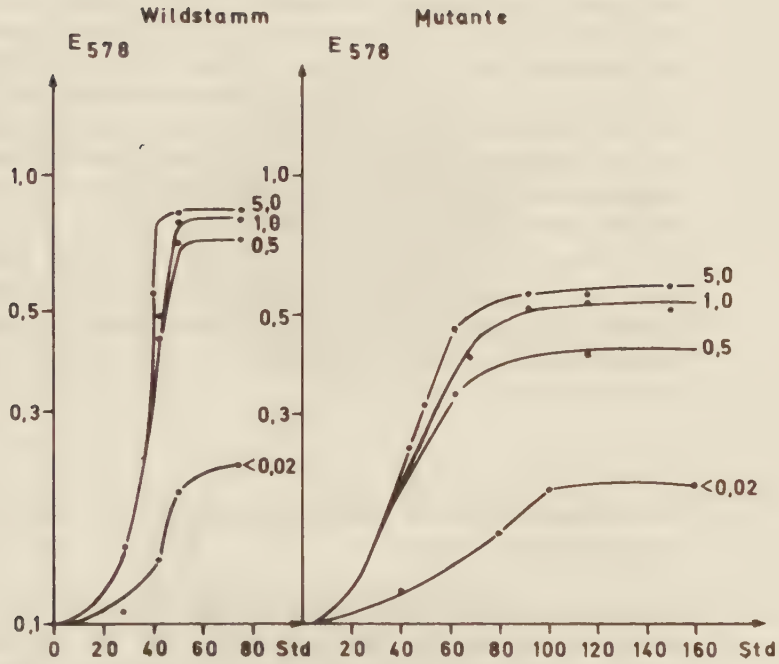


Abbildung 3.: Wachstum von Wildstamm und Mutante in Medium III mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen, ohne Natrium. Die Zahlen an den Kurven bezeichnen die Kaliumkonzentrationen der Nährlösungen in mMol K^+/l.

3. 1. 3. Wachstum auf Platten mit einem Natriumgradienten

Die bisher beschriebenen Versuche wurden alle in Medien ohne Zusatz von Natrium durchgeführt. Die Annahme liegt nahe, daß bei Zugabe anderer einwertiger Kationen, speziell von Natrium, diese Ionen mit dem Kalium um die Aufnahme in die Zelle konkurrieren. Der Gradientenplattentest sollte klären, ob solche Konkurrenzsituationen eine Auswirkung auf die Wachstumsansprüche der Testorganismen gegenüber Kalium haben. Es wurden Platten ohne Zusatz von Kalium und einem Natriumgradienten von 0,02-10^3 mMol/l benutzt.

Die mit dem Wildstamm angeimpfte Platte zeigt ein, wenn auch zur Natriumseite hin verringertes, Wachstum auf der gesamten Agarfläche. Bei der Mutante wird durch steigende Natriumkonzentrationen das Wachstum vollständig verhindert (Abbildung 4.).

3. 1. 4. Bestimmung der Natriumkonzentration, die ein Wachstum der Mutante verhindert

Die Wachstumsgrenze der Mutante auf den in Abbildung 4. gezeigten Gradientenplatten verschiebt sich mit zunehmender Dauer der Inkubation. Liegt sie nach viertägiger Inkubation im unteren Drittel der Platte, so ist nach sieben Tagen ungefähr eine Hälfte der Agaroberfläche bewachsen.

Durch Versuche mit Flüssigkulturen sollte deshalb die Natriumkonzentration ermittelt werden, die ein Wachstum der Mutante vollständig verhindert. In den Abbildungen 5. und 6.sind die Ergebnisse der Versuchsreihe dargestellt.

Wie die Wachstumskurven der Abbildung 5. bestätigen,wächst der Wildstamm, wenn auch verzögert, noch in Medien mit einer Natriumkonzentration von 10^3 mMol/l.

Abbildung 4. Wachstum von Wildstamm und Mutante auf Gradientenplatten mit einem Natriumgradienten von $0{,}02\text{-}10^{3}$ mMol/l ohne Zusatz von Kalium.
Inkubationsdauer: 5 Tage
Die Na^{+}-Konzentration sinkt in Richtung des Pfeils

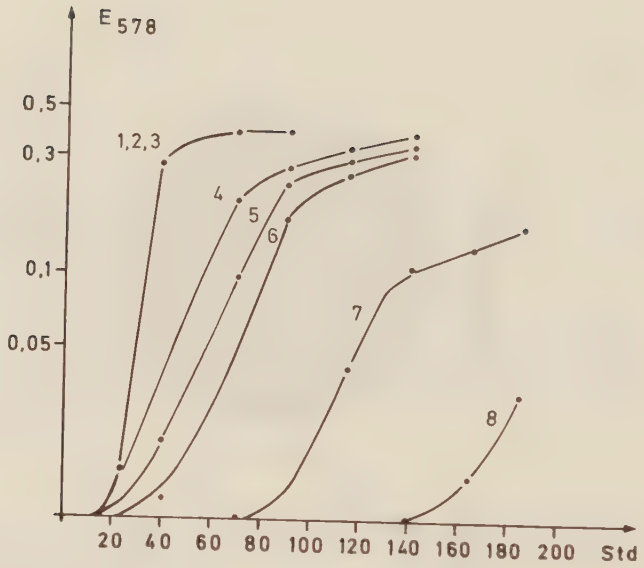


Abbildung 5.: Wachstum des Wildstammes in Medium III mit unterschiedlichen Konzentrationen an Natrium ohne Zusatz von Kalium.

Gemessene Kaliumkonzentration: 0,02 mMol/l

1. 0 mMol Na^+/l
2. 50 mMol Na^+/l
3. 100 mMol Na^+/l
4. 400 mMol Na^+/l
5. 500 mMol Na^+/l
6. 600 mMol Na^+/l
7. 800 mMol Na^+/l
8. 10^3 mMol Na^+/l

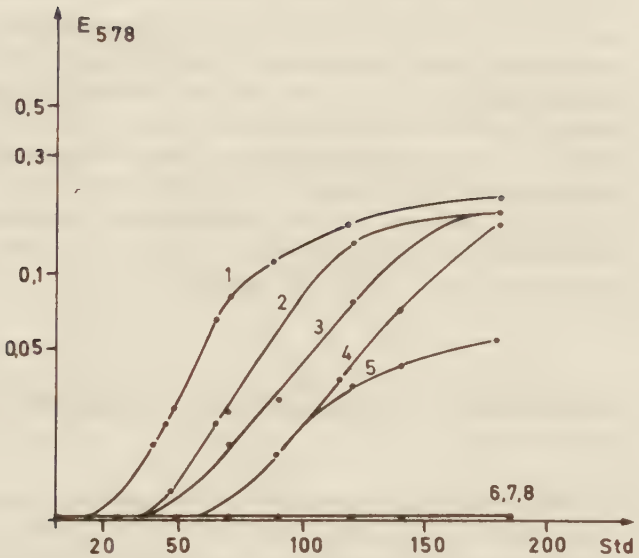


Abbildung 6.: Wachstum der Mutante in Medium III mit unterschiedlichen Konzentrationen an Natrium ohne Zusatz von Kalium.

Gemessene Kaliumkonzentration: 0,02 mMol/l

1. 0 mMol Na^+/l	2. 50 mMol Na^+/l
3. 100 mMol Na^+/l	4. 400 mMol Na^+/l
5. 500 mMol Na^+/l	6. 600 mMol Na^+/l
7. 800 mMol Na^+/l	8. 10^3 mMol Na^+/l

Bei der Mutante, Abbildung 6., ist bei Natriumkonzentrationen über 500 mMol/l kein Wachstum mehr nachzuweisen.

Aus der Erhöhung der extracellulären Natriumkonzentrationen ergibt sich eine Verzögerung des Wachstumsbeginns und eine Verlangsamung des Wachstums. Hierbei zeigen sich Unterschiede zwischen Wildstamm und Mutante. Beim Wildstamm rufen erst Natriumkonzentrationen über 200 mMol/l eine reproduzierbare Verlangsamung hervor (Wachstum bei 200 mMol Na^+/l ist identisch mit dem Wachstum bei 0-100 mMol Na^+/l in Abbildung 5.). Bei der Mutante wirkt sich schon die Zugabe von 50 mMol Na^+/l verlangsamend aus.

3. 1. 5. Aufhebung der wachstumshemmenden Wirkung des Natrium durch Kalium

Die Unterdrückung des Wachstums der Mutante durch steigende Natriumkonzentrationen ist nicht durch die damit verbundene Erhöhung des osmotischen Wertes der Nährlösung hervorgerufen. Ersetzt man bei einer Natriumkonzentration von 600 mMol/l das Natrium stufenweise durch Kalium, so beginnt die Mutante entsprechend der Zunahme der Kaliumkonzentration wieder zu wachsen (Abbildung 7.).

Die Wachstumszunahme des Wildstammes unter diesen Bedingungen (Abbildung 8.) entspricht der in Abbildung 3. bei Erhöhung der extracellulären Kaliumkonzentration ohne Natrium. Gleichzeitig ist eine Aufhebung der durch Natrium hervorgerufenen Wachstumsverlangsamung zu beobachten.

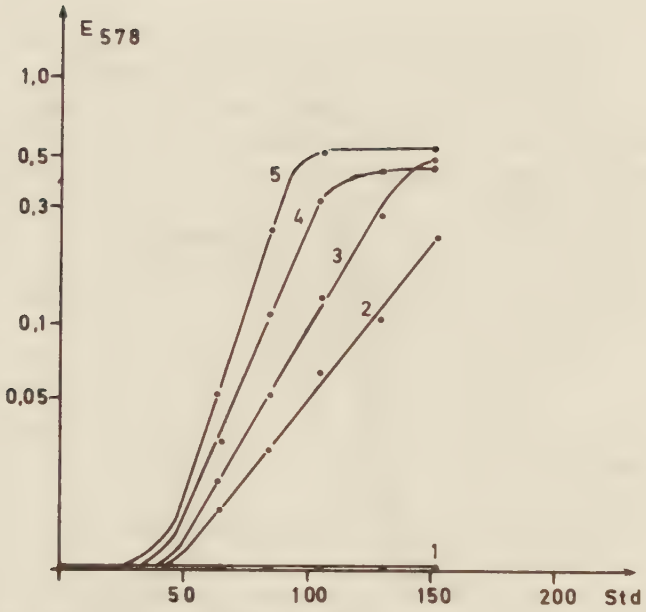


Abbildung 7.: Wachstum der Mutante in Medium III mit den angegebenen Konzentrationen an Kalium und Natrium.

1. 600,0 mMol Na^+/l + 0 mMol K^+/l
2. 599,5 mMol Na^+/l + 0,5 mMol K^+/l
3. 599,0 mMol Na^+/l + 1,0 mMol K^+/l
4. 575,0 mMol Na^+/l + 25,0 mMol K^+/l
5. 550,0 mMol Na^+/l + 50,0 mMol K^+/l

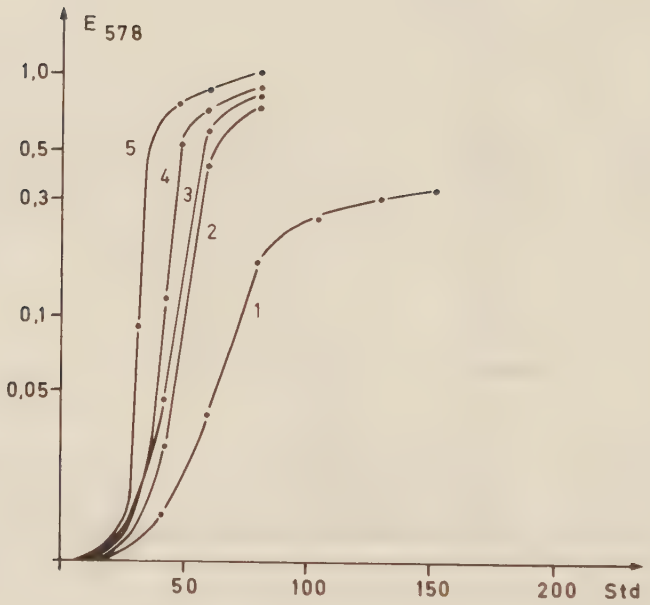


Abbildung 8.: Wachstum des Wildstammes in Medium III mit den angegebenen Konzentrationen an Kalium und Natrium.

1. 600,0 mMol Na^+/l + 0 mMol K^+/l
2. 599,5 mMol Na^+/l + 0,5 mMol K^+/l
3. 599,0 mMol Na^+/l + 1,0 mMol K^+/l
4. 575,0 mMol Na^+/l + 25,0 mMol K^+/l
5. 550,0 mMol Na^+/l + 50,0 mMol K^+/l

3. 1. 6. Einfluß ionophorer Substanzen auf das Wachstum der Mutante

Die Mutante wird durch steigende Natriumkonzentrationen am Wachstum gehindert. Sollte dieser Effekt auf den Verlust der Makrotetrolidproduktion zurückzuführen sein, müsste Verfütterung von Makrotetroliden eine Rekonstitution des Wachstums der Mutante bei hohen Natriumkonzentrationen hervorrufen. Es ist zu erwarten, daß eine solche Rekonstitution sehr konzentrationsabhängig ist, da ein Überangebot an Carriern zu einer Störung des Kaliumhaushaltes der Zelle führen dürfte. Die Methode der Wahl, weil mit verhältnismäßig geringem Arbeitsaufwand verbunden, die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen eines Stoffes auf einen Testkeim zu untersuchen, ist der Streifengradiententest.

Nach Ergebnissen von Visser und Postma (1973) hat Valinomycin einen Effekt auf den Kaliumtransport von Azotobacter vinelandii nur in Medien, die Tris und EDTA enthalten. Es wurden deshalb nicht nur die Makrotetrolide bzw. das Valinomycin, sondern auch die in Tabelle 2. aufgeführten Substanzgemische, auf eine das Wachstum der Mutante rekonstituierende Wirkung getestet.

Aus der Abbildung 9. wird der Versuchsansatz deutlich. In Richtung des Natriumgradienten, der Wachstum der Mutante nur auf einem Teil der Platte zuläßt, wurde ein mit dem zu untersuchenden Substanzgemisch (Tabelle 2.) getränkter Filterpapierstreifen aufgelegt. Quer zu dem Natriumgradienten bildet sich durch Diffusion ein Konzentrationsgradient der Testsubstanzen. Bei einer das Wachstum rekonstituierenden Wirkung der Substanzen hätte man in einigem Abstand zum Teststreifen eine Wachstumszone zu höheren Natriumkonzentrationen hin erwarten können.

Tabelle 2.: Kombinationen der Substanzen, die im Streifengradiententest auf eine das Wachstum der Mutante rekonstituierende Wirkung getestet wurden.

Kombination	Makrotetrolide (1mg/ml)	Valinomycin (1mg/ml)	Tris (1mg/ml)	EDTA (1mg/ml)
1	+			
2	+		+	
3	+		.	+
4	+		+	+
5		+		
6		+	+	
7		+		+
8		+	+	+

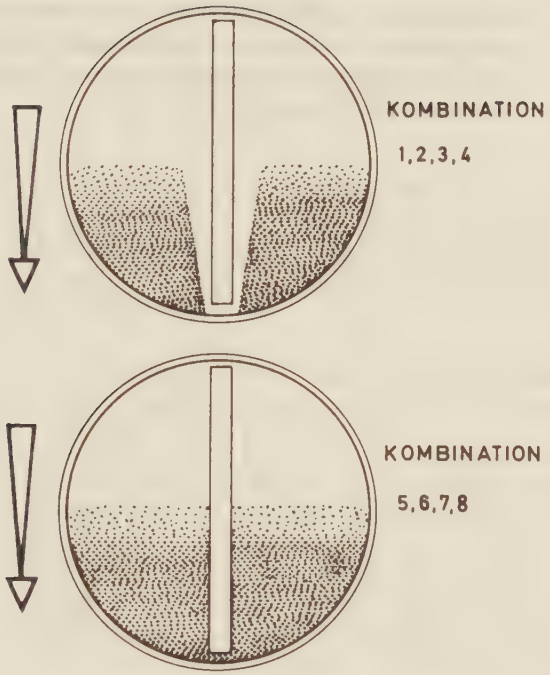


Abbildung 9.: Wirkung ionophorer Substanzen auf das Wachstum der Mutante bei steigenden Natriumkonzentrationen. Verwendet wurden Platten mit einem Natriumgradienten von $0{,}02\text{-}10^{3}$ mMol/l ohne Zusatz von Kalium. Die Filterpapierstreifen wurden vor dem Auflegen auf die Platten entsprechend dem Schema der Tabelle 2. mit den zu untersuchenden Substanzen getränkt und getrocknet. Die Na^{+}-Konzentration sinkt in Richtung des Pfeils.

Die Ergebnisse des Streifengradiententestes zeigt Abbildung 9. Die Makrotetrolide wirken mit und ohne Tris und EDTA antibiotisch auf die Mutante. Die antibiotische Wirkung nimmt mit steigender Natriumkonzentration zu. Valinomycin wirkt unter den Versuchsbedingungen nicht antibiotisch. Eine das Wachstum rekonstituierende Wirkung war bei keinem Testansatz zu beobachten.

3. 2. Intracelluläre Kalium-, Natriumkonzentrationen

Nach der Gleichung von Schultz und Solomon (1961) errechnet sich die Kalium-Innenkonzentration folgendermaßen:

$$[K_I] = \frac{K_p - FG \cdot ER \cdot [K_e]}{FG \cdot (1 - ER) - TG}$$

$[K_I]$ = intracelluläre Kaliumkonzentration (mMol/l); K_p = Kaliumgehalt der Probe (10^{-6} Mol); FG = Feuchtgewicht der Probe (g); TG = Trockengewicht der Probe (g); ER = extracellulärer Raum (ml/g FG); $[K_e]$ = extracelluläre Kaliumkonzentration (mMol/l).

Mit der gleichen Formel läßt sich die intracelluläre Natriumkonzentration berechnen, wenn man für die entsprechenden Werte Na_p und $[Na_e]$ einsetzt.

Feucht- und Trockengewicht wurden für jede Messung extra gemessen. Die Ergebnisse der Bestimmung des extracellulären Raumes sind in Tabelle 3. aufgeführt.

Tabelle 3.: Extracellulärer Raum bei Wildstamm und Mutante

	Wildstamm	Mutante
Mittelwert	0,7 ml/gFG	0,7 ml/gFG
Zahl der Messungen	30	30
Standardabweichung	± 0,077	± 0,076

3. 2. 1. Intracelluläre Kaliumkonzentrationen während des Wachstums

Die Testorganismen können nicht nur in Medien mit einem Minimum an Kalium wachsen, sondern auch Kalium auf ein Vielfaches der extracellulären Konzentration anreichern (Abbildung 10.).

Die Kalium-Innenkonzentration ist abhängig von dem Alter der Kultur. Es lassen sich zwei Maxima unterscheiden. Das Erste liegt zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase. Es ist bei der Mutante gegenüber dem Wildstamm um 5-10 Std. verschoben. Die Kaliumanreicherung beginnt ungefähr 20 Std. nach dem Animpfen und dauert 10-15 Std. Die hierbei erreichten Kaliumkonzentrationen in der Zelle liegen zwischen 80 und 90 mMol/l. Sie sind für Wildstamm und Mutante gleich. Anschließend sinkt die Konzentration und erreicht nach 50 Std. mit 20-30 mMol/l ihren tiefsten Wert. Nach 90 Std. beginnen die Testorganismen wieder Kalium anzureichern. Das zweite Maximum wird nach 120 Stunden erreicht. Mit intracellulären Kaliumkonzentrationen zwischen 150 und 160 mMol/l werden etwa doppelt so hohe Konzentrationen erreicht, wie zu Beginn der log-Phase. 140 Std. nach dem Animpfen fallen die Werte wieder auf 40-50 mMol/l ab.

Das zweite Maximum der Kaliumanreicherung ist nicht sehr konstant. Es kann je nach Kulturbedingungen bis zu 50 Std. früher oder auch 10 Std. später beginnen. Selbst bei konstanten Kulturbedingungen sind verhältnismäßig große Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturen festzustellen.

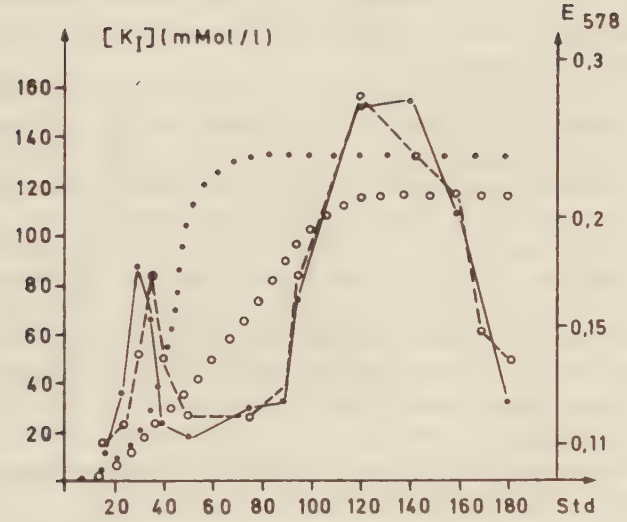


Abbildung 10.: Intracelluläre Kaliumkonzentrationen $[K_I]$ von Wildstamm •——• und Mutante o----o bei Wachstum in Medium III ohne Zusatz von Natrium und Kalium. Gemessene Kaliumkonzentration des Mediums zu Beginn des Wachstums: 0,01 mMol/l
••••• Wachstum Wildstamm; ooooo Wachstum Mutante
Die Punkte der intracellulären Kaliumkonzentrationen sind Mittelwerte von jeweils 5 Einzelkulturen.

Verhältnismäßig konstant ist die Kaliumanreicherung zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase. Abbildung 11. veranschaulicht die Auswirkungen steigender extracellulärer Kaliumkonzentrationen auf die Kaliumanreicherung zu Beginn des Wachstums. Das Maximum der intracellulären Kaliumkonzentration des Wildstammes liegt bei allen Versuchen 30-35 Std. nach dem Animpfen. Das der Mutante 35-45 Std. nach dem Animpfen.
Das extracelluläre Kalium ist nur bei extrem niedrigen Konzentrationen begrenzender Faktor für die Kaliumanreicherung (Abbildung 11.a.). 40 Stunden nach dem Animpfen läßt sich kein Kalium im Medium mehr nachweisen. Schon 0,2 mMol K^+/l Medium reichen den Teststämmen aus, um optimale intracelluläre Kaliumkonzentrationen zu erreichen (Abbildung 11.b.). Das Maximum der Mutante bleibt gegenüber dem Wildstamm um 10 Std. verschoben, wie sich auch aus der verzögerten Abnahme der extracellulären Kaliumkonzentration ablesen läßt. Die erreichten Innenkonzentrationen liegen etwa doppelt so hoch wie bei Medien ohne Kaliumzusatz. Auffällig ist, daß die Konzentration im Medium weiter absinkt, auch nachdem die Kaliumkonzentration in den Zellen ihr Maximum erreicht hat.

Weitere Erhöhung der Kaliumkonzentration im Medium führt zu keiner Steigerung der intracellulären Kaliumkonzentrationen (Ergebnisse nicht dargestellt). Selbst Wachstum unter optimalen Bedingungen in Medium I hat keine Auswirkung auf die intracellulären Kaliumkonzentrationen (Abbildung 11.c.).

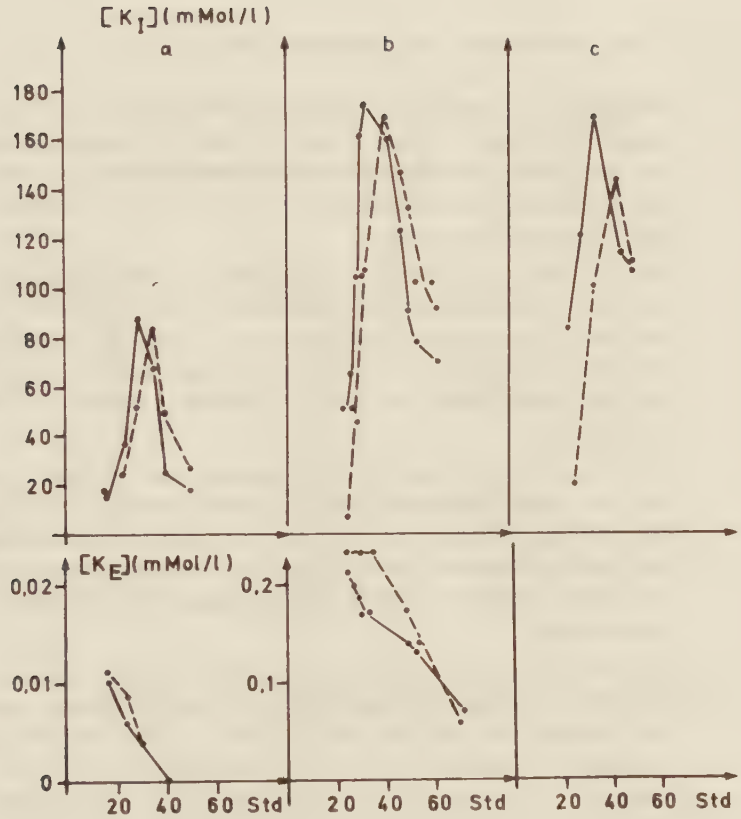


Abbildung 11.: Intracelluläre Kaliumkonzentrationen $[K_I]$ und extracelluläre Kaliumkonzentrationen $[K_E]$ von Wildstamm •——• und Mutante o----o bei Wachstum in unterschiedlichen Nährmedien. a. Medium III ohne Zusatz von K^+ und Na^+; b. Medium III mit 0,2 mMol K^+/l ohne Natrium; c. Medium I; in Medium I läßt sich die Kaliumaufnahme durch die Testorganismen nicht durch eine meßbare Abnahme der $[K_E]$ nachweisen.

3. 2. 2. Kaliumaufnahme der Testorganismen

Abbildung 12. zeigt die Kaliumaufnahme von Zellen nach Resuspension in Medium III mit 10 mMol K^+/l ohne Natrium. Wie man sieht ist die Veränderung der intracellulären Kaliumkonzentration abhängig von dem Zeitpunkt zu dem die Zellen geerntet werden.

Nach 75 Std. läßt sich eine geringfügige Erhöhung der intracellulären Kaliumkonzentration beobachten, die jedoch nur vorübergehend ist. Bereits nach 15 Min. beginnt die Kalium-Innenkonzentration wieder abzusinken. Die kurzfristige Kaliumaufnahme ist bei der Mutante stärker als beim Wildstamm.

Erntet man die Zellen 20 Std. später, nach 95 Std., steigen die Konzentrationen von Wildstamm und Mutante um ungefähr 200 mMol/l an. Der Anstieg ist nicht vorübergehend. Eventuelle Unterschiede zwischen den beiden Testorganismen sind nicht sehr ausgeprägt und lassen sich auch nicht reproduzieren.

Wiederum ein anderes Bild ergibt sich, werden die Kulturen nach 150 Std. abzentrifugiert. Zu diesem Zeitpunkt ergeben sich erhebliche Unterschiede zwischen Wildstamm und Mutante. Während die Zunahme bei der Mutante nur ca. 90 mMol K^+/l beträgt, ist die Kaliumaufnahme des Wildstammes gegenüber der nach 95 Std. nur geringfügig verändert.

Diese Ergebnisse sind wichtig für die Interpretation der folgenden Kurzzeitversuche.

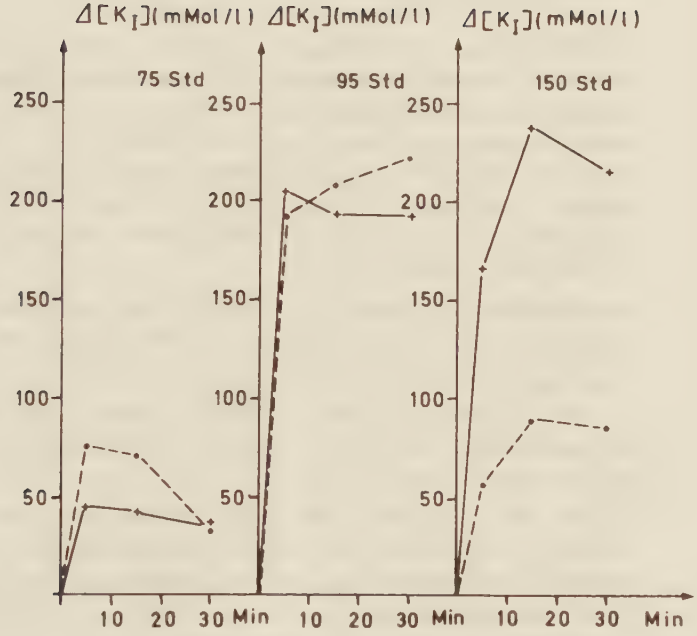


Abbildung 12.: Einfluß des Zellalters auf die Zunahme der intracellulären Kaliumkonzentration von Zellen nach Resuspension in Medium III mit 10 mMol K^+/l ohne Natrium.

×——× Wildstamm; o----o Mutante

Anzucht der Zellen: Medium III ohne Kalium und Natrium

3. 2. 3. Einfluß extracellulärer Kalium-, Natriumkonzentrationen auf die Kaliumaufnahme

Die für die nun beschriebenen Versuche verwendeten Zellen wurden in Medium I angezogen. Auf Grund der Erfahrungen mit der unterschiedlichen Kaliumaufnahme von Zellen in verschiedenen Wachtumsphasen (Abbildung 12.), wurden die Kulturen für die folgenden Versuche nach 40 Std. abzentrifugiert. Zu diesem Zeitpunkt läßt sich nach Abbildung 11. c eine hohe intracelluläre Kaliumkonzentration bei Wachstum in Medium I erwarten.

Die Mutante (Abbildung 13. b) zeigt eine gegenüber dem Wildstamm (Abbildung 13. a) verringerte Kaliumaufnahme.

Senkt man die extracelluläre Kaliumkonzentration von 20 mMol/l (Kurve 1) auf 0,2 mMol/l (Kurve 3), so nimmt die Kaliumaufnahme sowohl des Wildstammes als auch der Mutante um ungefähr die Hälfte ab.

Bei 20 mMol K^+/l führt die Zugabe von 200 mMol Na^+/l bei beiden Testorganismen zu einer Verlangsamung der Kaliumaufnahme. Der Effekt ist bei der Mutante deutlicher als beim Wildstamm (Kurven 1, 2). Die Zunahme der Kalium-Innenkonzentration wird nicht beeinflusst.

Augenscheinlicher wird die unterschiedliche Hemmung der Kaliumaufnahme durch Natrium bei einer extracellulären Kaliumkonzentration von 0,2 mMol K^+/l (Kurven 3, 4). Der Wildstamm ist unter diesen Bedingungen noch in der Lage Kalium aufzunehmen, während die intracelluläre Kaliumkonzentration der Mutante unter den Ausgangswert absinkt.

Die Anhäufung von Kalium in der Zelle ist ein energieverbrauchender Vorgang. Die in den Abbildungen 14. und 15. dargestellten Versuche sollten klären, wie sich die intracellulären Kalium-, Natriumkonzentrationen von Zellen verändern, denen keine Energiequelle zur Verfügung steht.

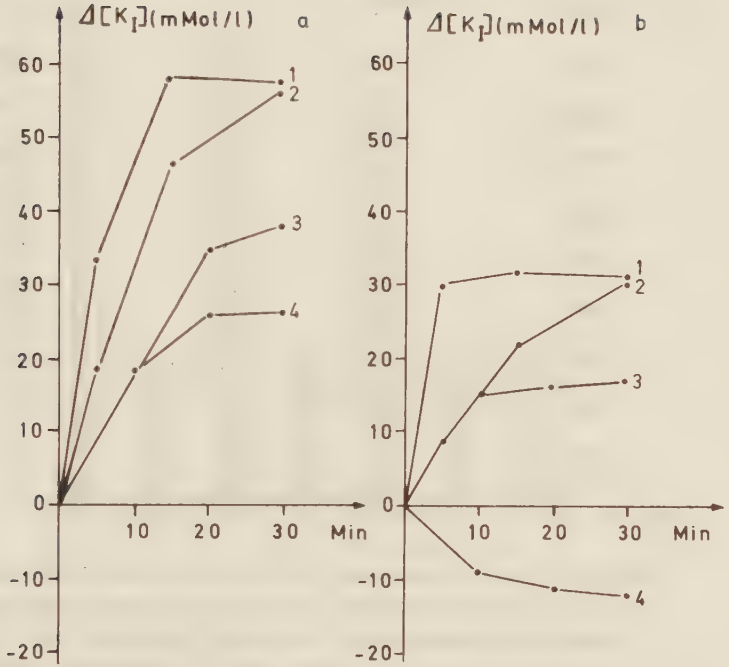


Abbildung 13.: Kaliumaufnahme von Wildstamm a. und Mutante b. nach Resuspension in Medium III mit unterschiedlichen Kalium-, Natriumkonzentrationen.
Anzucht der Zellen : Medium I
Alter der Kulturen : 40 Std.
1. 20,0 mMol K^+/l + 0 mMol Na^+/l
2. 20,0 mMol K^+/l + 200 mMol Na^+/l
3. 0,2 mMol K^+/l + 0 mMol Na^+/l
4. 0,2 mMol K^+/l + 200 mMol Na^+/l

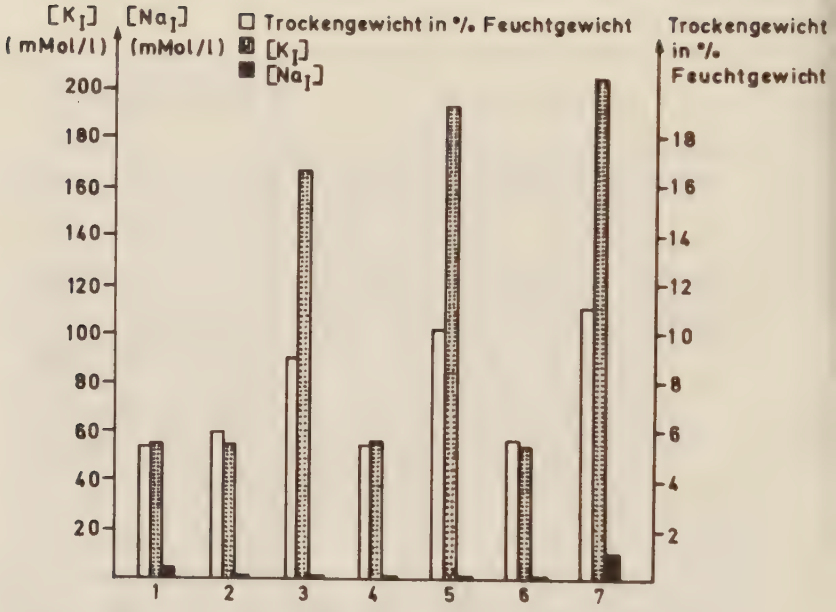


Abbildung 14.: Veränderung der intracellulären Kalium-, Natriumkonzentration und des Zellvolumen, ausgedrückt durch Trockengewicht in % Feuchtgewicht, beim Wildstamm. Die Zellen wurden nach 48 stündigem Wachstum in Medium I abzentrifugiert und 18 Std. ausgehungert. Während dieser Zeit wurden sie jeweils 3 Std. in den angegebenen Medien ohne C-Quelle inkubiert.

1 O-Wert nach 48 stündigem Wachstum in Medium I
2 Medium III ohne Kalium und Natrium
3 Medium III ohne Kalium mit 200 mMol Na^+/l
4 Medium III ohne Kalium und Natrium
5 Medium III ohne Kalium mit 200 mMol Na^+/l
6 Medium III ohne Kalium und Natrium
7 Medium III ohne Kalium mit 200 mMol Na^+/l

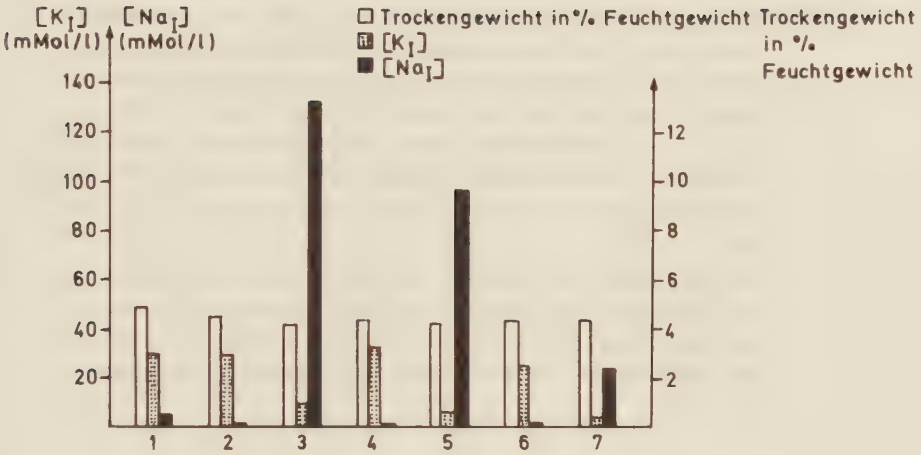


Abbildung 15.: Veränderung der intracellulären Kalium-, Natriumkonzentrationen und des Zellvolumen bei der Mutante. Durchführung siehe Abbildung 14.

Hierzu wurden die Stämme in Medium I angezogen und nach 48 Std. die intracellulären Kalium-, Natriumkonzentrationen bestimmt (Abbildung 14., 15., 1). Nach zweimaligem Waschen mit IA-Wasser wurden die Zellen nacheinander in die angegebenen Medien (siehe Legende zu Abbildung 14.) überführt, 3 Stunden inkubiert und die Innenkonzentration der Kationen gemessen. Die Kaliumkonzentration nach Inkubation in kalium-und natriumfreiem Medium zeigt in beiden Fällen nur eine geringe Veränderung gegenüber dem Ausgangswert, während das intracelluläre Natrium fast vollständig verschwunden ist (Abbildung 15., 14., 2)

Nach Überführung der Wildstammzellen in Medium mit 200 mMol Na/l findet man keine Aufnahme von Natrium, aber eine Erhöhung der intracellulären Kaliumkonzentration. Gleichzeitig

läßt sich, auf Grund der Zunahme des Trockengewichtes in Prozent des Feuchtgewichtes, ein Schrumpfen der Zellen beobachten. Die Zellen nehmen demnach kein zusätzliches Kalium auf, sondern die Kalium-Innenkonzentration wird durch Verkleinerung des Zellvolumen erhöht (Abbildung 14. 3). Bei der Mutante bleibt das Zellvolumen annähernd konstant. Dafür ist ein starkes Einfließen des Natrium und gleichzeitiges Ausfließen von Kalium zu beobachten (Abbildung 15. 3).

Die Veränderungen, sowohl des Wildstammes als auch der Mutante, sind reversibel, wie sich durch Resuspension in natriumfreiem Medium zeigen läßt (Abbildung 14., 15. 4). Der Vorgang läßt sich mehrmals wiederholen (Abbildung 14., 15. 5-7).

3. 2. 4. Einfluß von Ouabain auf die Kaliumaufnahme

Die Strophantusglykoside, zu denen auch das Ouabain gehört, hemmen eine K^+-Na^+-abhängige ATPase. In höheren Organismen ist dieses Enzym für einen Kalium-Natrium-Antiport durch Membranen verantwortlich (Wolf u. Peter, 1972).

Die Wirkung von Ouabain auf die Kaliumaufnahme der Testorganismen zeigen die Werte der Tabelle 4.

Beim Wildstamm führt schon eine Ouabainkonzentration von 0,05 mg/ml zu einer meßbaren Abnahme der Kaliumaufnahme. Eine 70 %ige Hemmung wird mit 0,25mg/ml erreicht. Weitere Erhöhung der Ouabainkonzentration bewirkt keine weitere Abnahme der Kaliumanreicherung.

Tabelle 4.: Kaliumaufnahme der Testorganismen nach Resuspension in Medium III mit 50 mMol K^+/l und unterschiedlichen Zusätzen an Ouabain.
Anzucht der Zellen: Medium III ohne Kalium und Natrium
Alter der Kulturen: 140 Std.

Ouabain (mg/ml)	$\Delta [K_I]$ nach 10 Min. (mMol/l)	
	Wildstamm	Mutante
0	+ 1140	+ 660
0,05	+ 509	+ 700
0,25	+ 288	+ 612
0,50	+ 363	+ 387
1,00	+ 284	- 78

Die Kaliumaufnahme der Mutante ist nicht so empfindlich gegenüber Ouabain, wie die des Wildstammes. Eine deutliche Veränderung läßt sich erst bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml nachweisen. Bei höheren Ouabainkonzentrationen wird die Kaliumanreicherung durch die Mutante allerdings stärker gehemmt. Während der Wildstamm bei 1 mg Ouabain/ml noch Kalium aufnimmt, sinkt die Kalium-Innenkonzentration der Mutante unter den Ausgangswert.

Tabelle 5.: Kaliumaufnahme der Mutante nach Resuspension in Medium III mit den angegebenen Zusätzen.
Anzucht der Zellen: Medium III ohne Kalium und Natrium
Alter der Kultur : 95 Std.

Zeit (Min)	$\Delta \left[K_I\right]$ (mMol/l)		
	10 mMol K^+/l	10 mMol K^+/l + Ouabain (1mg/ml)	10 mMol K^+/l + Ouabain (1mg/ml) + Makrotetrolidgemisch (0,01mg/ml)
10	+ 40	- 3,1	- 0,8
30	+ 78,5	+ 1,5	+ 5,3
60	+ 69,5	+ 40,0	+ 15,5

Durch zusätzliche Verfütterung von Makrotetroliden sollte versucht werden, die Kaliumaufnahme der Mutante zu rekonstituieren. Die Werte der Tabelle 5. zeigen, daß dies nicht gelingt. Auch durch Zusatz von Tris und EDTA kann keine Wirkung der Makrotetrolide hervorgerufen werden.

Wie sich ebenfalls aus den Werten der Tabelle ablesen läßt, ist die Wirkung des Ouabain nur vorübergehend. Schon nach 30 Min. beginnt die Mutante wieder Kalium in die Zelle aufzunehmen.

4. Diskussion

Ziel der Suche nach Kaliummangelmutanten ist, Einblick in die molekularen Vorgänge des Kaliumtransportes zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, einen Teil des Problems durch entgegengesetzte Fragestellung zu lösen. Aufgabe war es, die Beteiligung einer bekannten Stoffgruppe, der Makrotetrolide, am physiologischen Kaliumtransport von Streptomyces griseus, Stamm Tü10, durch Vergleich mit einer Makrotetrolid-minus Mutante, nachzuweisen. Darüberhinaus sollte ein Vergleich der Makrotetrolid-minus Mutante mit Kaliummangelmutanten anderer Mikroorganismen Hinweise für eine generelle Beteiligung ionophorer Substanzen am Kaliumtransport ergeben.

Kaliummangelmutanten lassen sich durch Unterschiede in folgenden Merkmalen characterisieren:

1. Wachstumsansprüche gegenüber Kalium
2. Kaliumanreicherung in der Zelle
3. Kaliumtransport in die Zelle

Im folgenden sollen die Ergebnisse der Arbeit in Hinblick auf diese drei Punkte diskutiert werden.

4. 1. Wachstumsansprüche gegenüber Kalium

Das Wachstum auf Kaliumgradientenplatten läßt keine Kaliumansprüche der Testorganismen erkennen. Die Wachstumskurven in Abbildung 3. bestätigen, daß die unvermeidlichen Verunreinigungen der Medien mit Kalium sowohl für ein Wachstum des Wildstammes, als auch der Mutante ausreichen. Der Wildstamm zeigt unter diesen Bedingungen ein schnelleres und etwas stärkeres Wachstum. Man könnte dies auf eine

effektivere Aufnahme der minimalen zur Verfügung stehenden Kaliummengen zurückführen. Aus Abbildung 11. a läßt sich jedoch eine vollständige Aufnahme des vorhandenen Kalium durch beide Teststämme ablesen. Wie die anderen Wachstumskurven der Abbildung 3. zeigen, wächst die Mutante auch bei höheren extracellulären Kaliumkonzentrationen langsamer als der Wildstamm. Ein Grund für den Unterschied zwischen beiden Stämmen kann in der verringerten Amylaseaktivität der Mutante (Tabelle 1.) liegen. Die Verwendung von Glukose als C-Quelle, bei der dieser Unterschied keine Rolle spielen sollte, war für die Versuche ungeeignet, da beide Testorganismen mit Glukose sehr schlecht wachsen.

Bei einem Minimum an Kalium wird das Wachstum der Mutante durch steigende Natriumkonzentrationen gehemmt (Abbildung 4.). K/Na-Verhältnisse von 4×10^{-5} verhindern das Wachstum der Mutante. Der Wildstamm wächst noch bei einem K/Na-Wert von 2×10^{-5} (Abbildungen 5., 6.). Ersetzt man bei einer Natriumkonzentration von 600 mMol/l das Natrium stufenweise durch Kalium, so beginnt die Mutante entsprechend den größer werdenden K/Na-Werten wieder zu wachsen (Abbildung 7.).

Die Unterschiede in den Wachstumsansprüchen zwischen Wildstamm und Mutante lassen sich in folgenden zwei Punkten zusammenfassen:

1. Nur bei hohen Natriumkonzentrationen benötigt die Mutante mehr Kalium zum Wachsen als der Wildstamm.

2. Verschlechterung des K/Na-Verhältnisses bewirkt bei beiden Stämmen eine Verlangsamung des Wachstums. Die Empfindlichkeit gegenüber Natrium ist bei der Mutante stärker als beim Wildstamm.

Durch Verfütterung von Makrotetroliden lassen sich die Unterschiede zwischen Wildstamm und Mutante nicht aufheben (Abbildung 9.). Aus den in der Einleitung (Seite 5/6)

dargelegten Gründen, nimmt die antibiotische Wirkung der Makrotetrolide mit steigender Natriumkonzentration, bzw. sinkendem K/Na-Verhältnis, zu.

Die Ergebnisse des Versuches schließen eine Beteiligung der Makrotetrolide am physiologischen Kaliumtransport der Zelle nicht aus. Vielleicht kann der Carrier nur an bestimmten Stellen der Membran, die von außen nicht erreicht werden können, seine physiologische Funktion erfüllen. Trifft er in ausreichender Konzentration an anderen Stellen auf die Membran, ruft er durch unphysiologische Wirkung die in der Einleitung beschriebene Hemmung des Zellstoffwechsels hervor.

Man kann davon ausgehen, daß trotz nicht gelungener Rekonstitution, die Unterschiede zwischen Wildstamm und Mutante durch den Verlust der Makrotetrolidproduktion hervorgerufen werden können.

4. 2. Kaliumanreicherung in der Zelle

Die Mutante kann, selbst in Medien mit minimalem Kaliumangebot, ebenso wie der Wildstamm Kalium auf ein Vielfaches der extracellulären Konzentration anreichern. Zu Beginn der log-Phase beträgt der Anreicherungsfaktor 1 : 2 x 10^4, in der stationären Phase 1 : 2 x 10^5. Diese Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie der von 1 : 10^6 bei E. coli, das ein sehr aktives Aufnahmesystem besitzt (Harold, 1972). Überführt man in kaliumreichen Medien gewachsene Zellen in Medien ohne Kalium und Natrium, sind beide Stämme in der Lage ihre intracellulären Kaliumkonzentrationen aufrecht zu erhalten (Abbildungen 14., 15. 1).

4. 3. Kaliumtransport in die Zelle

Der Einfluß des Natrium auf das Wachstum der Testorganismen läßt einen durch die Mutation unspezifischer gewordenen Kaliumtransport der Mutante vermuten. Um begründetere Aussagen über diese Vermutung machen zu können, soll zunächst der Kaliumhaushalt der Teststämme beschrieben werden.

Im Verlaufe des Wachstums lassen sich sehr unterschiedliche Kaliumkonzentrationen in den Zellen nachweisen. Übereinstimmend mit Ergebnissen von Schultz und Solomon (1961) bei E. coli wird Kalium zu Beginn der log-Phase in den Zellen angereichert. Gegen Ende des exponentiellen Wachstums sinken die intracellulären Konzentrationen wieder ab. Im Gegensatz zu E. coli findet in der stationären Wachstumsphase eine erneute Kaliumaufnahme statt (Abbildung 10.). Wie Abbildung 11. zeigt ist die ungleichmäßige Verteilung des Kalium während des Wachstums nicht auf den Kaliummangel im Medium zurückzuführen. Bei extracellulären Kaliumkonzentrationen unter 0,2 mMol/l erreicht die Kaliumanreicherung zwar nicht die optimalen Werte, aber auch bei höheren Kaliumkonzentrationen im Medium sind starke Schwankungen der intracellulären Kaliumwerte zu beobachten.

Aus den Ergebnissen läßt sich eine Regulation der intracellulären Kaliumkonzentrationen durch den Stoffwechsel der Zelle ableiten. Die Kaliumanreicherung in der log-Phase ist durch die in der Einleitung (Seite 1, 2) beschriebenen Stoffwechselfunktionen des Kalium hinreichend begründet. Für die Kaliumanreicherung in der stationären Wachstumsphase ist anzunehmen, daß sie durch die beginnende Sporulation hervorgerufen wird, da auch in sporulierenden Zellen von Bacillus subtilis hohe Kaliumkonzentrationen beobachtet worden sind (Eisenstadt, 1972). Ein weiterer Grund könnte in dem bei Streptomyceten ausgeprägten Sekundärmetabolismus, z. B. der Antibioticaproduktion oder Pigmentbildung, liegen,

der hauptsächlich in der stationären Wachstumsphase zu beobachten ist.

Die Regulation der intracellulären Kaliumkonzentration kann auf folgenden Mechanismen beruhen:

1. Regulation durch Veränderung des Zellvolumen
2. Regulation durch Kaliumausfluß
3. Regulation durch Kaliumaufnahme

Eine Erhöhung der intracellulären Konzentrationen durch Schrumpfen der Zellen ist unter normalen Kulturbedingungen unwahrscheinlich, da in diesem Fall eine Veränderung des Verhältnisses zwischen Feucht-und Trockengewicht der Zellen hätte beobachtet werden müssen. Eine Veränderung des Zellvolumen in einem mit der Methode nicht nachweisbaren Maße kann zwar nicht ausgeschlossen werden, eine Konzentrationsänderung in dem beschriebenen Ausmaß kann dadurch jedoch nicht hervorgerufen werden.

Bei einer Regulation der Innenkonzentration durch den Ausfluß von Kalium sollten Zellen einer Kultur, die sich in einer Wachstumsphase befindet in der die Innenkonzentrationen sinken (Abbildung 10., 11.), besonders durchlässig für Kalium sein. Mit der in den Abbildungen 14. bzw. 15., 1 und 2 dargestellten Methode wurden Zellen unterschiedlich alter Kulturen auf Kaliumausfluß untersucht. In keinem Fall konnte ein Absinken der intracellulären Kaliumkonzentration beobachtet werden.

Die Kaliumaufnahme ist abhängig von dem Alter der untersuchten Kulturen (Abbildung 12.). Zu einem Zeitpunkt niederer Kalium-Innenkonzentrationen (Abbildung 10.) wird nur wenig Kalium in die Zelle aufgenommen. Führt man den Versuch zu einem Zeitpunkt durch, zu dem die intracellulären Kaliumkonzentrationen ansteigen, kann ein sehr aktives Transportsystem nachgewiesen werden.

Verläßliche Aussagen über eventuelle Unterschiede im Transportsystem, insbesondere über eine unterschiedliche Hemmbarkeit des Transportes durch Natrium, können nur mit Hilfe kinetischer Untersuchungen gemacht werden. Die Ergebnisse der Abbildungen 10., 11. und 12. veranschaulichen, daß die Interpretation eines Vergleichs kinetischer Daten von Wildstamm und Mutante bei den untersuchten Streptomyceten problematisch ist und zwar aus folgenden Gründen:

1. Stationäre intracelluläre Kaliumkonzentrationen, wie sie nach Zimmermann und Pilwat (1971) kinetische Untersuchungen bei E. coli ermöglichen, lassen sich mit Kulturen von Streptomyceten nicht erreichen.

2. Wegen des verlangsamten Wachstums der Mutante lassen sich Zellen von Wildstamm und Mutante mit identischem Wachstumszustand, das heißt mit gleicher intracellulärer Kaliumkonzentration und gleicher Aktivität des Kaliumtransportes, nur in der stationären Wachstumsphase untersuchen. Auf Grund der unregelmäßig einsetzenden Aktivierung des Transportsystemes zu diesem Zeitpunkt sind Kulturen beider Stämme mit gleich aktiven Zellen, wie zum Beispiel in Abbildung 12. nach 95 Std., Zufall und die Ergebnisse lassen sich nicht reproduzieren. Ein Ausweg wäre, wenn man das intracelluläre Kalium auswaschen könnte, was bei der Mutante geht, nicht aber beim Wildstamm (Abbildungen 14., 15.).

Aus den geschilderten Gründen wurde auf Erarbeitung exakter kinetischer Daten verzichtet.

Aus den gleichen Gründen dürfen die Unterschiede zwischen Wildstamm und Mutante in der Kaliumaufnahme bei Abwesenheit von Natrium (Abbildung 13. 1, 3) nicht im Sinne eines durch die Mutation veränderten Kaliumtransportes interpretiert werden. Was sich aus den Ergebnissen ablesen läßt ist, daß der Kaliumtransport der Mutante durch Natrium stärker gehemmt wird, als der des Wildstammes (Abbildung 13. 1,2;3,4).

Der Wildstamm ist demnach in der Lage, selektiver Kalium aufzunehmen, wodurch sein Vorteil bei Wachstum in Medien mit hohen Natriumkonzentrationen erklärt ist.

Ein unspezifischer Transport von Kationen bei der Mutante läßt sich auch aus den Abbildungen 14. und 15. ableiten. Obwohl, nach Überführung der Mutante in Medien mit hohen Natriumkonzentrationen, die Konzentrationen in den Zellen unter dem Wert der extracellulären bleiben, scheint die Natriumaufnahme ein aktiver Vorgang zu sein, was zu verstehen ist, wenn man bedenkt, daß biologische Membranen dem Durchtritt von Kationen einen großen Widerstand entgegensetzen (Läuger, 1972). Die mit zunehmender Aushungerungszeit abnehmende Natriumaufnahme läßt sich demnach durch Abnahme der zur Verfügung stehenden Energiereserven erklären. Das Sinken der intracellulären Kaliumkonzentration weist auf einen teilweisen Austausch zwischen Kalium und Natrium hin. Der Wildstamm reagiert unter den gleichen Bedingungen mit einem Schrumpfen der Zellen, ohne Natrium aufzunehmen.

4. 4. Unterschiede im Phaenotyp bekannter Kaliummangelmutanten

Defekte im cellulären Kaliumhaushalt von Mutanten lassen sich auf Mutationen unterschiedlicher Gene des Bakterienchromosoms zurückführen. Bei E. coli K12 konnten Epstein und Kim (1971) neun verschiedene Gene mit Einfluß auf den Kaliumtransport kartieren. Nach Harold et al. (1967) lassen sich Kaliummangelmutanten auf Grund unterschiedlicher Phaenotypen in zwei Gruppen einteilen.

1. Mutanten, die hohe extracelluläre Kaliumkonzentrationen zum Wachstum benötigen und nicht in der Lage sind, aufgenommenes Kalium in der Zelle zurückzuhalten (Lubochinsky et al., 1964). Natriumbeladene Zellen dieses Typs

können auch bei Zugabe von Kalium das intracelluläre Natrium nur sehr schlecht gegen Kalium austauschen. Als Ursache für die Merkmale dieses Phaenotyps schlugen Günther und Dorn (1966) eine durch die Mutation veränderte Diffusion des Kalium aus der Zelle vor. Ein veränderter Kaliumtransport wurde bei keiner Mutante dieses Typs beschrieben.

Isoliert wurden solche Mutanten von E. coli (Lubin u. Kessel, 1960) und Streptococcus faecalis (Harold et al., 1967). Nach einem Vorschlag von Lubochinsky werden sie als Cn_{K6}^{-}-Mutanten bezeichnet (1964).

2. Mutanten mit einem veränderten Kaliumtransport in die Zelle. Die Kaliumansprüche dieses Mutantentyps werden in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Slayman und Tatum (1965), sowie Damadian (1968) geben einen gegenüber dem Wildstamm geringfügig erhöhten Kaliumbedarf für das Wachstum und unterschiedliche K_m-Werte für die Kaliumaufnahme an. Harold und Baarda (1967) konnten diese Effekte nur bei steigenden Natriumkonzentrationen beobachten, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. Der scheinbare Widerspruch zu den beiden ersten Autoren wird verständlich, wenn man beachtet, daß in beiden Fällen die Versuche in Medien mit etwa 50 mMol Na^{+}/l durchgeführt wurden. Der Einfluß unterschiedlicher Natriumkonzentrationen auf Wachstum und Kaliumtransport sind in diesen Arbeiten nicht beschrieben. Mutanten dieses Typs sind in der Lage Kalium in der Zelle anzureichern. Natriumbeladene Zellen können das intracelluläre Natrium gegen Kalium austauschen. Mutanten mit diesem Phaenotyp wurden von Neurospora crassa (Slayman u. Tatum, 1965), Streptococcus faecalis (Harold u. Baarda, 1967) und E. coli (Damadian, 1968) beschrieben. Harold und Baarda bezeichnen diesen Mutantentyp als Tr_{K8}^{-}.

Epstein unterscheidet bei E. coli K12 kdp-Mutanten mit nur geringfügig gesteigerten Kaliumansprüchen (Epstein u. Davies, 1970) und trk-Mutanten mit ausgeprägtem Kaliumbedarf

Tabelle 6.: Vergleich bekannter Kaliummangelmutanten mit der Makrotetrolid-minus Mutante von Streptomyces griseus

Merkmal	Cn_{K6}^--Typ	Tr_{K8}^--Typ	Makrotetrolid-minus Mutante
Wachstum benötigt hohe extracelluläre Kaliumkonzentrationen	+	-	-
Kaliumanreicherung bei Kaliummangel	-	+	+
Kaliumausfluß bei Kaliummangel	+	-	-
Austausch von intracellulärem Natrium gegen Kalium	-	+	+
Kaliumtransport in die Zelle verändert	-	+	+

(Epstein u. Kim, 1971). Auf Grund von Genkartierungen lassen sich die kdp-Mutanten den oben beschriebenen Tr_{K8}^--Mutanten von E. coli zuordnen. Die Gene der verschiedenen trk-Mutanten liegen auf dem ganzen Chromosom verstreut. Eine generelle Zuordnung der trk-und Cn_{K6}^--Mutanten ist deshalb nicht möglich.

Wie aus der zusammenfassenden Gegenüberstellung in Tabelle 6. hervorgeht, stimmen die Unterschiede im Kaliumhaushalt zwischen dem Makrotetrolide produzierenden Streptomycetenstamm und der Makrotetrolid-minus Mutante mit den Merkmalen überein, in denen sich eine ganze Gruppe von Kaliummangelmutanten von den entsprechenden Wildstämmen unterscheidet. Es ist demnach denkbar, daß die Ausprägung eines solchen Phaenotyps auf dem Verlust eines Kaliumcarriers beruht.

4. 5. Transportmodelle

Bei nicht zu ungünstigen K/Na-Verhältnissen ist die Makrotetrolid-minus Mutante in der Lage, Kalium in der Zelle anzureichern. Ungeklärt ist, ob die Aufnahme über den gleichen, nur unspezifischer gewordenen, Mechanismus erfolgt wie beim Wildstamm, oder ob zwei verschiedene Transportsysteme vorhanden sind.

Der Transport von Kaliumionen muß von einem gleichzeitigen parallel gerichteten Einfließen von Anionen, oder einem entgegengesetzten Ausfließen von Kationen begleitet sein, da sonst hohe Potentialdifferenzen an der Membran entstünden. Schultz und Mitarbeiter (1963) ziehen auf Grund von Untersuchungen an E. coli einen Kationenaustausch vor. Übereinstimmend mit Ergebnissen bei Streptococcus faecalis (Zarlengo u. Schultz, 1966) beschreiben sie zwei Vorgänge beim Transport von Kalium in die Zelle:

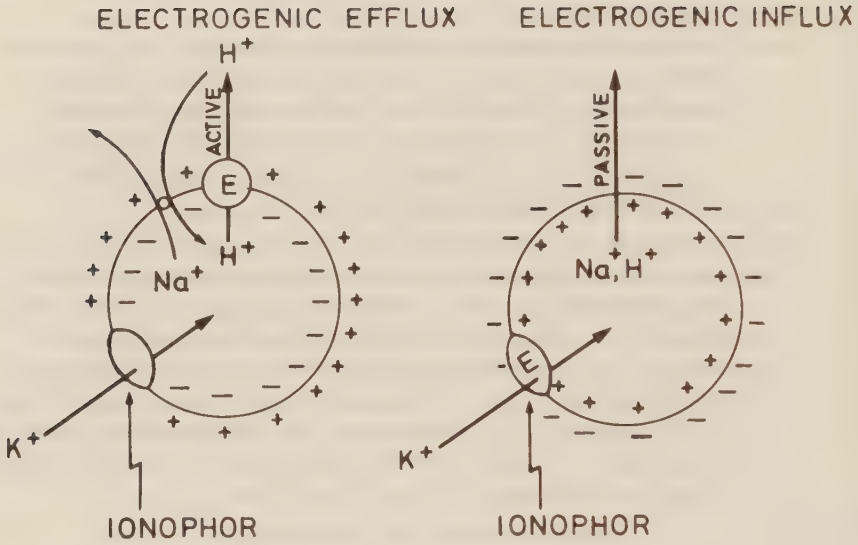
1. Einen Austausch von Kalium gegen Protonen
2. Einen Austausch von Kalium gegen Natrium

Entsprechende Vorgänge konnten bei der Kaliumaufnahme von Hefen nachgewiesen werden (Conway u. O'Malley, 1946; Rothstein u. Enns, 1946; Foulkes, 1956).

Für den Mechanismus der Kopplung dieser Transportvorgänge gibt es zwei entgegengesetzte Modellvorschläge, siehe Abbildung 16.

Das Schema links in Abbildung 16. entspricht der Theorie der chemiosmotischen Kopplung, wie sie ursprünglich von Mitchell (1966) als Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien vorgeschlagen worden ist und die anschließend von Harold und Baarda (1968) und von West (1970) für die Interpretation von Transportsystemen verwendet wurde.

Nach Harold et al. (1970) ist der Ausstoß von Protonen der



K^+ AUFNAHME WIRD HERVORGERUFEN DURCH AKTIVEN AUSSTOSS VON PROTONEN UND VON NATRIUM

AKTIVE AUFNAHME VON K^+ BEWIRKT EINEN PASSIVEN AUSFLUSS VON NATRIUM ODER PROTONEN

Abbildung 16.: Mögliche Mechanismen der Kopplung zwischen Kaliumaufnahme und dem Ausstoß von Na^+ und K^+ nach Lombardi et al. (1973)

Primärprozeß. Durch diesen Protonentransport wird ein pH-Gradient, innen alkalisch (Harold et al., 1970) und ein Membranpotential, innen negativ erzeugt (Harold u. Papineau, 1972). Das Membranpotential ist nach dieser Theorie die Energiequelle für den Transport des Kalium in die Zelle. Der Durchtritt des Kalium durch die Membran

läßt sich als eine durch spezifische, lipophile Carrier erleichterte Diffusion vorstellen.

Auf Grund von Untersuchungen über die Rubidiumaufnahme durch Membranvesikel kommen Lombardi et al. (1973) zu einem entgegengesetzten Modell für den Kaliumtransport in die Zelle. Nach ihren Ergebnissen ist der Kaliumtransport analog den Transportsystemen für Zucker und Aminosäuren (Kaback u. Millner, 1970; Kaback u. Barnes, 1971) direkt mit dem Stoffwechsel gekoppelt. Sie postulieren eine, durch ionophore Substanzen vermittelte, aktive Kaliumaufnahme, siehe rechter Teil von Abbildung 16. Auf Grund des so entstehenden Membranpotentials, innen positiv, fließen Na^+ und H^+ Ionen aus der Zelle aus.

Für die Interpretation der bisher diskutierten Versuchsergebnisse ist es unwichtig, welches der vorgeschlagenen Modelle sich als richtig erweist, da sie mit beiden Mechanismen in Einklang gebracht werden können. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, daß die Menge der ausfließenden Protonen abhängig von der verwendeten C-Quelle ist. Bei Glukose überwiegt der Ausfluß von Protonen die Kaliumaufnahme, bei Pyruvat und Lactat wird mehr Kalium aufgenommen als Protonen ins Medium abgegeben werden (L'Orange u. Frommer-Evers, 1972). Durch Postulierung eines Na^+/H^+-Antiports, siehe Abbildung 16., läßt sich die Theorie der chemiosmotischen Kopplung mit diesen Ergebnissen in Einklang bringen. Allerdings sollte in diesem Fall der Ausstoß von Natrium abhängig von der verwendeten C-Quelle sein, was noch nicht untersucht wurde.

Abweichend von den besprochenen Modellen konnte in Wirbeltierzellen ein direkter K/Na-Antiport nachgewiesen werden. 1957 beschrieb Skou erstmals das Vorkommen einer durch K^+ und Na^+ aktivierbaren ATPase in Krabbennerven. In Erythrocytenmembranen ist der Transport von K^+ und Na^+ mit der Aktivität dieses Enzyms gekoppelt (Post et al., 1960).

Inzwischen konnte dieses Enzym in fast allen Wirbeltierzellen nachgewiesen werden (Bonting et al., 1961). Strophantusglykoside, wie zum Beispiel das Ouabain, hemmen spezifisch diese K/Na-ATPase (Dunham u. Glynn, 1961). Für den Mechanismus dieses K/Na-Antiports schlugen Stein et al. (1973) das in Abbildung 17. veranschaulichte Modell vor.

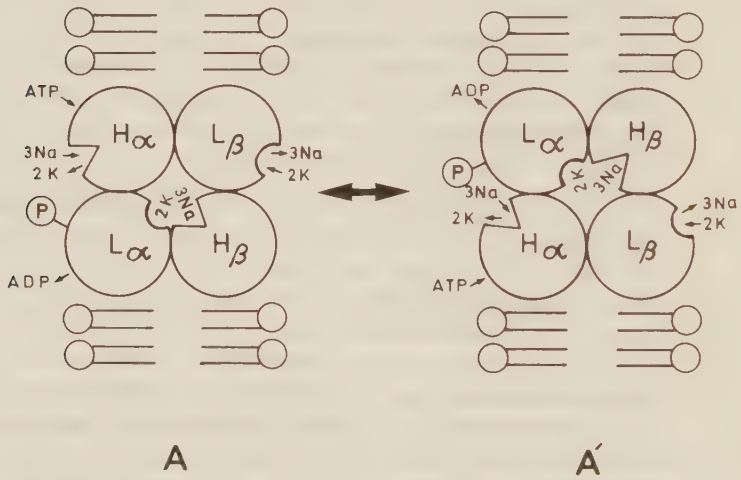


Abbildung 17.: Modell für den aktiven Transport von Natrium und Kalium durch eine ATPase, bestehend aus vier Untereinheiten, nach Stein et al. (1973). H - Untereinheit mit hoher Affinität für Natrium und niedriger für Kalium; L - die entgegengesetzte Situation. Jede Bindungsstelle kann abwechselnd H oder L sein. Transport resultiert aus einem hin und her Springen zwischen den energiegleichen Konformationen A und A'.

Bei E. coli wiesen Solomon (1962) sowie Hafkenscheid und Bonting (1968) eine ATPase-Aktivität nach, die durch

Ouabain gehemmt wird. Die Existenz eines entsprechenden Enzyms postulierten Kleber und Aurich (1967) für Pseudomonas aerigunosa.

Aus der Wirkung des Ouabain auf die untersuchten Streptomyceten (Tabelle 4.) läßt sich die Existenz von zwei Kaliumtransportsystemen beim Wildstamm ableiten. Bei einer Hemmung der K/Na-ATPase wäre der Wildstamm auf Grund seines zweiten Transportsystems weiterhin in der Lage, Kalium zu transportieren. Für die Mutante müsste man annehmen, daß der Verlust der Makrotetrolidproduktion zu einem Verlust des Ouabain-resistenten Transportsystems führt, oder, was wahrscheinlicher ist, dieses System unspezifisch wird für Kalium. Die Erhöhung der minimalen Hemmkonzentration bei der Mutante ließe sich durch Induzierung des ouabainsensiblen Transportsystems durch Kaliummangel erklären. Eine Stimulierung des Kaliumtransportes durch Kaliummangel wurde bereits bei Streptococcus faecalis beschrieben (Abrams u. Smith, 1971). Die nur vorübergehende Wirkung des Ouabain (Tabelle 5.) läßt sich evtl. auf Inaktivierung zurückführen, da Strophantusglykoside empfindlich gegenüber pH-Änderungen sind (Auterhoff, 1968). Die für vollständige Hemmung der Kaliumaufnahme benötigten Ouabainkonzentrationen liegen etwa um eine Zehnerpotenz über dem für eine Hemmung der ATPase von E. coli angegebenen Wert (Hafkenscheid u. Bonting, 1968). Ein unspezifischer Effekt auf die Zellmembran der Testorganismen ist deshalb nicht auszuschließen. Ein direkter Vergleich wäre nur durch in vitro Versuche und der Nachweis einer K/Na-ATPase nur durch die Isolierung des Enzyms möglich.

4. 6. Ausblick

Der Beweis für eine Beteiligung der Makrotetrolide am physiologischen Kaliumtransport der Testorganismen konnte nicht vollständig erbracht werden, da eine Rekonstitution der Unterschiede zwischen Wildstamm und Mutante nicht gelang. Nach einer Methode von Kaback (1968) lassen sich Membranvesikel von E. coli herstellen, bei denen eine Beteiligung von Valinomycin am aktiven Kaliumtransport nachgewiesen werden konnte (Bhattacharyya et al., 1971; Lombardi et al., 1973). Es ist zu erwarten, daß bei Anwendung einer entsprechenden Methode auch in diesem Fall der Nachweis gelingen würde. Ungeklärt bliebe in diesem Fall weiterhin, ob es sich hierbei um einen physiologischen Vorgang handelt.

In der Arbeit wurde Übereinstimmung in den Merkmalen der Makrotetrolid-minus Mutante mit einer Reihe von Kaliummangelmutanten anderer Mikroorganismen festgestellt. Reizvoller sollte es deshalb sein, Methoden auszuarbeiten, mit deren Hilfe es gelingt, die Bildung ionophorer Substanzen auch in anderen Mikroorganismen nachzuweisen.

Auch die Beteiligung einer durch Ouabain hemmbaren ATPase am Kaliumtransport von Streptomyceten sollte durch Isolierung des entsprechenden Enzyms geklärt werden.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine Beteiligung der Makrotetrolide am physiologischen Kaliumtransport, im Sinne der Kaliumcarrierhypothese von Zähner (1969), nachzuweisen. Der Makrotetrolidproduzent Streptomyces griseus Stamm Tü10 wurde mit einer Makrotetrolid-minus Mutante verglichen. Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Keine unterschiedlichen Kaliumansprüche der Testorganismen bei Wachstum in Medien ohne Natrium.

2. Gesteigerte Kaliumansprüche der Mutante bei steigenden Natriumkonzentrationen.

3. Die Kaliumanreicherung in den Zellen der Mutante unterscheidet sich nicht von der des Wildstammes.

4. Nach Überführung der Mutante in Medien mit hohen Natriumkonzentrationen wird Natrium aktiv aufgenommen, die intracelluläre Kaliumkonzentration sinkt. Der Wildstamm nimmt kein Natrium auf und gibt kein Kalium ab.

5. Unterschiede in der Kaliumaufnahme zwischen Wildstamm und Mutante lassen sich nur bei hohen extracellulären Natriumkonzentrationen nachweisen.

6. Die Kaliumaufnahme beider Testorganismen ist durch Ouabain hemmbar. Die Hemmung setzt beim Wildstamm bei niederen Konzentrationen ein als bei der Mutante. Andererseits ist bei hohen Konzentrationen die Hemmung der Mutante stärker als die des Wildstammes.

Die Merkmale der Mutante wurden mit denen anderer Kaliummangelmutanten verglichen.

6. Literaturverzeichnis

Abrams, A.: Metabolically dependent penetration of oligosaccharides into bacterial cells and protoplasts. J. Biol. Chem. 235, 1281-1285 (1960)

Abrams, A. und J. Smith: Increased membrane ATPase and K^+ transport rates in Streptococcus faecalis induced by K^+ restriction during growth. Biochem. biophys. Res. Commun. 44, 1488-1495 (1971)

Auterhoff, H.: Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH, Stuttgart: 1968

Beck, J., H. Gerlach, V. Prelog und W. Voser: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 35. Mitt. Über die Konstitution der Makrotetrolide Monactin, Dinactin und Trinactin. Helv. Chim. Acta 45, 620-630 (1962)

Bhattacharyya, P., W. Epstein und S. Silver: Valinomycin induced uptake of potassium in membrane vesicles from E. coli. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 68, 1488-1492 (1971)

Bonting, S.L., K.A. Simon und N.M. Hawkins: Studies on sodium-potassium activated adenosine triphosphatase. I. Quantitative distribution in several tissues of the cat. Arch. Biochem. Biophys. 95, 416-423 (1961)

Cockrell, R.S., E.J. Harris und B.C. Pressman: Energetics of potassium transport in mitochondria induced by valinomycin. Biochemistry 5, 2326-2334 (1966)

Conway, E.J. und E. O'Malley: The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0,02 n-H ion. Biochem. J. 40, 59-67 (1946)

Corbaz, R., E. Ettlinger, E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, F. Kradofler, L. Neipp, V. Prelog und H. Zähner: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 3. Mitt. Nonactin. Helv. Chim. Acta 38, 1445-1448 (1955)

Damadian, R.: Ion metabolism in a potassium accumulation mutant of E. coli B. I. Potassium metabolism. J. Bacteriol. 95, 113-122 (1968)

Dominguez, J., J.D. Dunitz, H. Gerlach und V. Prelog: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 32. Mitt. Über die Konstitution von Nonactin. Helv. Chim. Acta 45, 129-138 (1962)

Dreyfuß, J. und A.B. Pardee: Regulation of sulfate transport in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 91, 2275-2280 (1966)

Dunham, E.T. und I.M. Glynn: Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. J. Physiol. 156, 274-293 (1961)

Eddy, A.A. und J.A. Nowacki: Stoicheiometrical proton and potassium ion movements accompanying the absorption of amino acids by the yeast Saccharomyces carlsbergensis. Biochem. J. 122, 701-711 (1971)

Eisenman, G., S.M. Ciani und G. Szabo: Some theoretically expected and experimentally observed properties of lipid bilayer membranes containing neutral molecular carriers of ions. Fed. Proc. 27, 1289-1304 (1968)

Eisenstadt, E.: Potassium content during growth and sporulation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 112, 264-267 (1972)

Ennis, H.L.: Role of potassium in the regulation of polysome content and protein synthesis in E. coli. Arch. Biochem. Biophys. 143, 190-200 (1971)

Ennis, H.L., K.D. Kievitt und R.F. Peterson: Requirements for in vivo synthesis of E. coli and Bacillus subtilis cell constituents. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 294, 87-93 (1973)

Epstein, W. und M. Davies: Potassium-dependent mutants of E. coli K-12. J. Bacteriol. 101, 836-843 (1970)

Epstein, W. und B.S. Kim: Potassium transport loci in E. coli K-12. J. Bacteriol. 108, 639-644 (1971)

Epstein, W. und S.G. Schultz: Ion transport and osmoregulation in bacteria. In: L.B. Guze: Microbial protoplasts, spheroplasts and L-forms, pp. 186-193. Baltimore: The Williams & Wilkins Co. 1968

Evans, H.J. und G.J. Sorger: Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. Ann. Rev. Plant Physiol. 17, 47-76 (1966)

Foulkes, E.C.: Cation transport in yeast. J. Gen. Physiol., 39, 687-703 (1956)

Gause, G.F., T.P. Preobrashenskaja, E.S. Kudrina, N.O. Blinov, L.D. Rjabova und M.A. Sveshnikova: Zur Klassifizierung der Actinomyceten. Jena: Gustav Fischer Verlag 1958

Gerlach, H., R. Hütter, W. Keller-Schierlein, J. Seibl und H. Zähner: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, 58. Mitt. Neue Makrotetrolide aus Streptomyceten. Helv. Chim. Acta 50, 1782-1793 (1967)

Graven, S.N., H.A. Lardy, D. Johnson und A. Rutter: Antibiotics as tools for metabolic studies. V. Effect of nonactin, monactin, dinactin, and trinactin on oxidative phosphorylation and adenosine triphosphatase induction. Biochemistry 5, 1729-1735 (1966)

Graven, S.N., H.A. Lardy und A. Rutter: Antibiotics as tools for metabolic studies. VI. Damped oscillatory swelling of mitochondria induced by nonactin, monactin, dinactin, and trinactin. Biochemistry 5, 1735-1742 (1966)

Graven, S.N., H.A. Lardy und S. Estrada: Antibiotics as tools for metabolic studies. VIII. Effect of nonactin homologs on alkali metal cation transport and rate of respiration in mitochondria. Biochemistry 6, 365-371 (1967)

Günther, T.H. und F. Dorn: Über den K-Transport bei der K-Mangelmutante E. coli B 525. Z. Naturforschg. 21b 1082-1088 (1966)

Hafkenscheid, J.C.M. und S.L. Bonting: Studies on Na^+-K^+-activated ATPase. XIX. Occurence and properties of a Na^+-K^+-activated ATPase in E. coli. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 151, 204-211 (1968)

Harold, F.M.: Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. Bacteriol. Rev. 36, 172-230 (1972)

Harold, F.M. und J.R. Baarda: Gramicidin, valinomycin, and cation permeability of Streptococcus faecalis. J. Bacteriol. 94, 53-60 (1967)

Harold, F.M. und J.R. Baarda: Inhibition of potassium transport by sodium in a mutant of Streptococcus faecalis. Biochemistry 6, 3107-3110 (1967)

Harold, F.M. und J.R. Baarda: Effects of nigericin and monactin on cation permeability of Streptococcus faecalis and metabolic capacities of potassium-depleted cells. J. Bacteriol. 95, 816-823 (1968)

Harold, F.M., J.R. Baarda und E. Pavlasova: Extrusion of sodium and hydrogen ions as the primary process in potassium ion accumulation by Streptococcus faecalis. J. Bacteriol. 101, 152-159 (1970)

Harold, F.M., R.L. Harold, J.R. Baarda und A. Abrams: A genetic defect in retention of potassium by Streptococcus faecalis. Biochemistry 6, 1777-1784 (1967)

Harold, F.M. und D. Papineau: Cation transport and electrogenesis by Streptococcus faecalis. I. The membrane potential. J. Membrane Biol. 8, 27-44 (1972)

Harold, F.M., E. Pavlasova und J.R. Baarda: A transmembrane pH gradient in Streptococcus faecalis: Origin and dissipation by proton conductors and N, N'-dicyclohexylcarbodiimide. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 196, 235-244 (1970)

Hopwood, D.A.: Genetics of the actinomycetales. In: G. Sykes und A. Skinner (Eds.): Actinomycetales: Characteristics and practical importance. pp. 131-154, London-New York: Academic Press 1973

Hütter, R.: Systematik der Streptomyceten unter besonderer Berücksichtigung der von ihnen gebildeten Antibiotica. Bibl. Microbiol. 6. Basel: Karger 1967

Kaback, H.R.: The role of the phosphoenolpyruvat-phosphotransferase system in the transport of sugars by isolated membrane preparations of E. coli. J. Biol. Chem. 243, 3711-3724 (1968)

Kaback, H.R. und E.M. Barnes: Mechanisms of active transport in isolated membrane vesicles. II. The mechanism of energy coupling between D-lactic dehydrogenase and ß-galactoside transport in membrane preparations from E. coli. J. Biol. Chem. 246, 5523-5531 (1971)

Kaback, H.R. und L.S. Millner: Relationship of a membrane bound D-(-) lactic dehydrogenase to amino acid transport in isolated bacterial membrane preparations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66, 1008-1015 (1970)

Kanne, R.: Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Makrotetrolidproduktion und Kaliumaufnahme. Diplomarbeit, Universität Tübingen 1972

Kanne, R., U. Klein-Vogler und H. Zähner: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 122. Mitt. Über Beziehungen zwischen Makrotetrolidbildung und Kaliumtransport bei Streptomyces griseus. Arch. Mikrobiol. 93, 205-218 (1973)

Keller-Schierlein, W.: Stereochemical aspects of macrotetrolide action and biosynthesis. In: Inhibitors, tools in cell research. 20. Colloquium der Gesellschaft für biologische Chemie. pp. 365-367. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 1969

Keller-Schierlein, W. und H. Gerlach: Makrotetrolide. Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe 26, 161-189 (1968)

Keller-Schierlein, W., H. K. Wipf, W. Pache, P. Jordan und H. Zähner: Mechanism of alkali cation transport in bulk membranes using macrotetrolide antibiotics. Biochem. biophys. res. Commun. 36, 387-393 (1969)

Kilbourne, B.T., J.D. Dunitz, L.A. Pioda und W. Simon: Structure of the K-complex with nonactin, a macrotetrolide antibiotic possesing highly specific K^+ transport properties. J. molec. Biol. 30, 559-563 (1967)

Kleber, H.P. und H. Aurich: Evidence for an inducible active transport of carnitine in Pseudomonas aeruginosa. Biochem. biophys. Res. Commun. 26, 255-260 (1967)

Klein-Vogler, U.: Makrotetrolid-negative Mutanten von Streptomyces griseus: Isolierung und Charakterisierung. Dissertation, Universität Tübingen 1973

Laeuger, P.: Carrier-mediated ion transport. Science 178, 24-30 (1972)

Lentz, B.: Zur Wirkung ionentransportierender Antibiotica unter Einfluß von Alkalisalzen. Diplomarbeit, Universität Tübingen 1971

Lin, E.C.C.: The genetics of bacterial transport systems. Ann. Rev. Genet. 4, 225-262 (1970)

Lombardi, F.J., J.P. Reeves und H.R. Kaback: Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles. XIII. Valinomycin-induced rubidium transport. J. Biol. Chem. 248, 3551-3565 (1973)

L `Orange, R. und Frommer-Evers, B.: Potentiometric analysis of the kinetics of the counter-current net transport of K^+-and H^+-ions across the membrane of E. coli B. Z. Naturforsch. 27b, 996-1000 (1972)

Lubin, M. und H.L. Ennis: On the role of intracellular potassium in protein synthesis. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 80, 614-631 (1964)

Lubin, M. und D. Kessel: Preliminary mapping of the genetic locus for potassium transport in E. coli. Biochem. biophys. Res. Commun. 2, 249-255 (1960)

Lubochinsky, B., J. Meury und J. Stolkowski: Cinétique des échanges de potassium chez l 'E. coli, souche B 207, qui ne peut croitre normalement qu'en presence de concentrations élevées en potassium. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 258, 5106-5109 (1964)

Mitchell, P.: Transport of phosphate across the osmotic barrier of Micrococcus pyogenes: Specifity and kinetics. J. gen. Microbiol. 11, 73-82 (1954)

Mitchell, P.: Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev. 41, 445-502 (1966)

Moore, C. und B.C. Pressman: Mechanism of action of valinomycin on mitochondria. Biochem. biophys. Res. Commun. 15, 562-567 (1964)

Mueller, P. und D.O. Rudin: Development of K^+-Na^+ discrimination in experimental bimolecular lipide membranes by macrocyclic antibiotics. Biochem. biophys. Res. Commun. 26, 398-404 (1967)

Pache, W.: Zur Wirkungsweise des Boromycins. Dissertation, Universität Tübingen 1969

Pape, H.: Zur Biosynthese der Makrotetrolide. I. Die Grundbausteine des Nonactins. Arch. Mikrobiol. 82, 254-264 (1972)

Pape, H. und P. Stahl: Zur Biosynthese der Makrotetrolide. II. Isolierung freier Nonactinsäuren und ihre Funktion als Vorstufen der Makrotetrolide. Arch. Mikrobiol. 85, 239-248 (1972)

Pioda, L.A., H.A. Wachter, R.E. Dohner und W. Simon: Komplexe von Nonactin und Monactin mit Natrium-, Kalium-und Ammoniumionen. Helv. Chim. Acta 50, 1373-1376 (1967)

Post, R.L., C.R. Merritt, C.R. Kinsolving und C.D. Albright: Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in human erythrocyte. J. Biol. Chem. 235, 1796-1802 (1960)

Pressman, B.C.: Induced active transport of ions in mitochondria. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 1076-1083 (1965)

Pridham, T.G., P. Anderson, C. Foley, L.A. Lindenfelser, C.W. Hesseltine und R.G. Benedict: A selection of media for maintenance and taxonomic study of Streptomyces. Antibiot. Ann. 947-953 (1956/57)

Rothstein, A. und L.H. Enns: The relationship of potassium to carbohydrate metabolism in baker's yeast. J. Cellular Comp. Physiol. 28, 231-252 (1946)

Schultz, S.G., W. Epstein und A.K. Solomon: Cation transport in E. coli. IV. Kinetics of net K uptake. J. gen. Physiol. 47, 329-346 (1963)

Schultz, S.G. und A.K. Solomon: Cation transport in E. coli. I. Intracellular Na and K concentrations and net cation movement. J. gen. Physiol. 45, 355-369 (1961)

Seshachalam, D., D.H. Frahm und F.M. Ferraro: Cation reversal of inhibition of growth by valinomycin in Streptococcus pyogenes and Clostridium sporogenes. Antimicrob. Agents Chemother 3, 63-67 (1973)

Short, S.A., D.C. White und H.R. Kaback: Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles. IX. The kinetics and specifity of amino acid transport in Staphylococcus aureus membrane vesicles. J. Biol. Chem. 247, 7452-7458 (1972)

Simon, W., L.A. Pioda und H.K. Wipf: Cation specifity of inhibitors. In: Inhibitors, tools in cell research. 20. Colloquium der Gesellschaft für biologische Chemie. pp. 356-364. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 1969

Skou, J.C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 23, 394-401 (1957)

Slayman, C.W. und E.L. Tatum: Potassium transport in Neurospora. III. Isolation of a transport mutant. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 109, 184-193 (1965)

Solomon, A.K.: Ion transport in single cell populations. Biophys. J. 2(2), 79-95 (1962)

Sorger, G.J., R.E. Ford und H.J. Evans: Effects of univalent cations on the immunoelectrophoretic behavior of pyruvic kinase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54, 1614-1621 (1965)

Stein, W.D., W.R. Lieb, S.J.D. Karlish und Y. Eilam: A model for active transport of sodium and potassium ions as mediated by a tetrameric enzyme. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 275-278 (1973)

Suelter, C.H.: Enzymes activated by monovalent cations. Patterns and predictions for these enzyme catalysed reactions are explored. Science 168, 789-795 (1970)

Suelter, C.H., R.Jr. Singleton, F.J. Kayne, S. Arrington, J. Glass und A.S. Mildvan: Studies on the interaction of substrate and monovalent and divalent cations with pyruvat kinase. Biochemistry 5, 131-138 (1966)

Suzuki, K., Y. Nawata und K. Ander: Tetranactin a new mitcidal antibiotic. J. Antibiotics 10, 675-680 (1971)

Tosteson, D.C.: Effect of macrocyclic compounds on the ionic permeability of artificial and natural membranes. Fed. Proc. 27, 1269-1277 (1968)

Visser, A.S. und P.W. Postma: Permeability of Azotobacter vinelandii to cations and anions. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 298, 333-340 (1973)

West. I.C.: Lactose transport coupled to proton movements in E. coli. Biochem. biophys. Res. Commun. 41, 655-661 (1970)

Wolf, H.U. und H.W. Peter: Kinetics of Na^+-K^+-ATPase of human erythrocyte membranes. Biochem. biophys. Acta (Amst.) 290, 310-320 (1972)

Zähner, H.: Biologie der Antibiotica. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 1965

Zähner, H.: Antibiotica und Ionentransport. Vortrag. Münster, Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (1969)

Zarlengo, M.H. und S.G. Schultz: Cation transport in Streptococcus faecalis. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 126, 308-320 (1966)

Zeiss: Analytical methods for atomic absorption and flame emission. Fa. Carl Zeiss, Oberkochen (1968)

Zeiss: Flammen-Spektralphotometer, Gebrauchsanleitung für die Absorptions-und Emissionsanalyse mit dem Flammenansatz FA2 und PMQ II. Fa. Carl Zeiss, Oberkochen

Zimmermann, U. und G. Pilwat: Untersuchungen über den Kaliumtransport in E. coli B. I. Einfluß von Ammoniumchlorid und der essentiellen Aminosäuren Histidin und Leucin auf die stationäre Kaliumverteilung in E. coli B 525. Z. Naturforsch. 26b, 887-893 (1971)

Lebenslauf

Am 30. April 1946 wurde ich in Bad Salzuflen geboren.

Von 1952 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Bad Salzuflen und anschließend das städtische mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Bad Salzuflen, an dem ich 1965 das Abitur bestand.

Nach einem halbjährigen Praktikum für Elektrotechnik und Maschinenbau wurde im Herbst 1965 der Beginn meines Studiums durch einen Einberufungsbescheid der Bundeswehr vorübergehend verhindert. Nach achtzehnmonatiger Dienstzeit begann ich mit dem Sommersemester 1967 mein Studium der Biologie mit Hauptfach Mikrobiologie an der Universität Tübingen. Nach zehnsemestrigem Studium in Tübingen und München erhielt ich im Juni 1972 mein Zeugnis über die Diplomprüfung in Biologie. Anschließend begann ich am Institut für Biologie der Universität Tübingen, Lehrbereich Mikrobiologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner mit der vorliegenden Arbeit.

Meine akademischen Lehrer waren:

In Tübingen: A. Anderer, E. Bayer, E. Bünning,
H. Diekmann, A. Gottschalk, K.G. Grell,
H. Günzl, J. Guglielmi, W. Hewers, H. Krüger,
W. Löffler, K. Mägdefrau, H. Metzner,
F.P. Möhres, K. Mörike, E. Müller, H. Peters,
H. Remmer, G. Richter, A. Rieker, W. Rüdorff,
G. Schramm, V. Schwartz, W. Schweizer,
G. Schwemmle, E. Stumpp, G. Weitzel, U. Weser,
H. Zähner, W. Zimmermann

In München : W. Bandlow, G. Boche, B. Gedek, R. Huisgen,
J. Kalich, F. Kaudewitz, W. Klingmüller,
F. Lynen, W. Rössner, K. Zipf